

Die Auswirkungen von Chondrodysplasie-assoziierten Mutationen auf die Struktur und Funktion des Cartilage Oligomeric Matrix Proteins

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jochen Thur

aus Köln

Copy Team Cologne, Köln

2000

Berichterstatter

Prof. Dr. Mats Paulsson

Prof. Dr. Dietmar Schomburg

Vorsitzender der Prüfungskommission

Prof. Dr. Börries Kemper

Tag der mündlichen Prüfung:

15.11.2000

Abstract

Mutations in type 3 repeats of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause two skeletal dysplasias, pseudoachondroplasia (PSACH) and multiple epiphyseal dysplasia (MED). Both diseases are characterized by short-limb dwarfism, early onset osteoarthritis and lamellar inclusions found in the rER of chondrocytes. The inclusions contain COMP, collagen IX and aggrecan.

I expressed recombinant wild-type COMP which showed identical structural and functional properties as COMP isolated from cartilage. A fragment encompassing the eight type 3 repeats binds 12 calcium ions with high affinity and very high cooperativity and presumably forms one large disulfide-bonded folding unit. A recombinant PSACH mutant COMP in which Asp469 was deleted (D469Δ) and a MED mutant COMP in which Asp361 was substituted by Tyr (D361Y) were both secreted into the cell culture medium of human cells. Circular dichroism spectroscopy revealed only small changes in the secondary structures of D469Δ and D361Y demonstrating that the mutations do not dramatically affect folding and stability of COMP. However, the local conformations of the type 3 repeats were disturbed and the number of bound calcium ions was reduced to eight and six, respectively. In addition to collagen I and II, also collagen IX binds to COMP with high affinity. The PSACH and MED mutations reduce the binding to collagens I, II and IX and result in an altered zinc dependency. These interactions may contribute to the development of the patient phenotypes and may explain why MED can be caused also by mutations in collagen IX genes.

Kurzzusammenfassung

Mutationen in den Typ 3 Motiven des Cartilage Oligomeric Matrix Proteins (COMP) verursachen zwei skeletale Fehlbildungen: Pseudoachondroplasie (PSACH) und Multiple Epiphysäre Dysplasie (MED). Für beide Erkrankungen sind kurzgliedriger Zwergwuchs, früh einsetzende Arthrose und lamelläre Einschlüsse im rER von Chondrocyten charakteristisch; die Einschlüsse enthalten COMP, Kollagen IX und Aggrecan.

Ich exprimierte rekombinant Wildtyp-COMP, das strukturell und funktionell identisch mit Gewebe-extrahiertem COMP ist. Ein die Typ 3 Motive umfassendes Proteinfragment, bindet 12 Ca^{2+} -Ionen mit hoher Affinität und Kooperativität und stellt vermutlich eine einzige, große Faltungseinheit dar, die durch Disulfidbrücken-stabilisiert wird. Auch rekombinantes COMP mit der PSACH-assoziierten Deletion von Asp469 (D469Δ) bzw. dem MED-assoziierten Austausch von Asp361 zu Tyr (D361Y) wurde von den humanen Zellen in das Kulturmedium sekretiert. Die Circular Dichroismus-Spektroskopie offenbarte nur geringe Veränderungen der Sekundärstruktur von D469Δ und D361Y; dies beweist, daß die Mutationen weder Faltung, noch Stabilität von COMP drastisch beeinflussen. Hingegen war die lokale Konformation der Typ 3 Motive deutlich gestört und die Anzahl gebundener Ca^{2+} -Ionen sank auf acht bzw. sechs. Neben Kollagen I und II bindet auch Kollagen IX mit hoher Affinität an COMP; die PSACH/MED-assoziierten Mutationen verringerten die Bindung an Kollagen I, II und IX und veränderten die Zink-Abhängigkeit der Bindung. Diese Wechselwirkungen könnten zur Ausprägung des klinischen PSACH/MED-Phänotyps beitragen und erklären, warum auch Kollagen IX-Mutationen zur Entstehung von MED führen können.

Inhalt

1. EINLEITUNG	1
1.1 Pseudoachondroplasie und Multiple Epiphysäre Dysplasie	1
1.2 Mutierte COMP- und Kollagen IX-Gene verursachen PSACH und MED	2
1.3 Das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)	4
1.4 Die Typ 3 Domäne von COMP	5
1.5 Die Extrazellulärmatrix des Knorpels	6
Glycosaminoglykane	7
Kollagene	8
1.6 Aufgabenstellung	11
2. MATERIALIEN UND METHODEN	12
2.1 Reagenzien, allgemeine Lösungen und Puffer	12
2.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten	12
2.3 Klonierung der Wildtyp COMP cDNA-Fragmente	16
2.4 <i>In vitro</i> Mutagenese der COMP cDNA	17
2.5 Rekombinante Expression der COMP-Fragmente	19
2.5.1 Zellkultur von 293-EBNA Zellen	20
2.5.2 Transfektion und Selektion der rekombinanten 293-EBNA Zellen und Ernte des serumfreien Kulturüberstandes	20
2.6 Allgemeine proteinchemische Arbeiten	21
2.7 Chromatographische Reinigung des rekombinanten COMP	22
2.7.1 Anionenaustauschchromatographie des Zellkulturüberstands	23
2.7.2 Gelfiltration der pentameren Proteine und von mCOMP	23
2.7.3 Gelfiltration der Proteine EGF-T3, T3 und der T3-Mutanten	24
2.7.4 Anionenaustausch-Chromatographie mit FPLC-Matrices	24
2.8 UV-Spektroskopie	25
2.9 Intrinsische Fluoreszenz von Proteinen	27
2.10 Fluoreszenz-Spektroskopie bei Ca^{2+} -Titration des Proteins	28
2.11 Circular Dichroismus-Spektroskopie	29
2.12 CD-Spektroskopie bei Ca^{2+} -Titration des Proteins	33
2.13 Anpassung verschiedener Bindungsmodelle an die Messwerte zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten und der Kooperativität	33
2.14 Analyse der Kollagenbindung im ELISA-artigen Festphasen-System	37
2.15 Messungen der Oberflächen Plasmon Resonanz	39
2.16 <i>Rotary shadowing</i> und Elektronenmikroskopie von COMP	40
2.17 Gleichgewichtsdialyse	41

3. ERGEBNISSE	42
3.1 Klonierung der COMP cDNA Konstrukte	42
3.1.1 Klonierung der cDNA von Wildtyp COMP	43
3.1.2 Einführung der Mutationen D361Y und D469Δ in die Wildtyp cDNA	44
3.2 Eukaryotische Expression der COMP-Konstrukte	44
3.3 Aufreinigung der oligomeren COMP Proteine	45
3.4 Aufreinigung der monomeren Fragmente EGF-T3, T3 und T3-7x	47
3.5 Apparentes Molekulargewicht der COMP-Proteine bei SDS-PAGE	48
3.6 Proteinsequenzierung der rekombinant exprimierten Proteine:	
Die Oligomere werden proteolytisch abgebaut	49
3.7 Glycosylierung von rekombinantem COMP	52
3.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des rekombinanten COMP	54
3.9 UV-Spektroskopie zur Quantifizierung der Proteinlösungen	54
3.10 UV-Spektroskopie zur Beurteilung der Aggregation	55
3.11 Analyse der Sekundärstruktur durch CD-Spektroskopie	58
3.12 Der Ca^{2+} -induzierte Konformationswechsel der Typ 3 Domäne	61
3.12.1 CD-Spektroskopie	61
3.12.2 Fluoreszenz-Spektroskopie	65
3.13 Bestimmung der Anzahl von Ca^{2+} -Bindungsstellen durch Gleichgewichtsdialyse	68
3.14 Die Ca^{2+} -Bindungsparameter der Typ 3 Domäne	69
3.15 Die COMP-Kollagen-Wechselwirkungen im Festphasen-System	70
3.15.1 COMP-Kollagen Interaktion in ELISA-artigen Experimenten	71
3.15.2 Elektronenmikroskopische Visualisierung der COMP-Kollagen-Interaktion	78
3.15.3 Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mit dem BiaCore System	79
4. DISKUSSION	81
4.1 Rekombinantes COMP entspricht strukturell	
und funktionell dem Gewebe-extrahierten COMP	81
4.2 COMP aggregiert bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen	83
4.3 Die Mutationen verändern die Konformation und Ca^{2+} -Bindung	83
4.4 Die Mutationen beeinflussen die Bindung von COMP an Kollagen	89
4.5 Modelle zur Pathogenese von PSACH und MED	89

5. ZUSAMMENFASSUNG	92
6. LITERATUR	94
7. ANHANG	102
7.1 Tabelle der bei PSACH und MED nachgewiesenen COMP-Mutationen	102
7.2 cDNA- und Protein-Sequenz von rekombinantem, reifem rCOMP	103
7.3 Sequenzvergleich von TSP3, TSP4 und COMP	106
7.4 Die Pentamerisierungsdomänen von TSP3, TSP4 und COMP	108
7.5 Gruppierung der Typ 3 Motive nach ihrer Homologie zum Konsensus der Ca ²⁺ -Bindungsstelle in der EF-Hand	109
DANKSAGUNG	110
ERKLÄRUNG	111
LEBENS LAUF	112

1. Einleitung

1.1 Pseudoachondroplasie und Multiple Epiphysäre Dysplasie

Die Pseudoachondroplasie (PSACH) und die Multiple Epiphysäre Dysplasie (MED) stellen autosomal dominant vererbte Erkrankungen dar, die zu Knochen- und Knorpelfehlbildungen führen. Beide Osteochondroplasien äußern sich in disproportioniertem Zwergwuchs mit normaler Schädelgröße und verkürzten, deformierten Extremitäten. Die Patienten zeigen ein watschelndes Gangbild; hinzu kommt eine früh einsetzende Arthrose der tragenden Gelenke, besonders von Hüften und Knien. Die Bänder und Sehnen sind überdehnbar, was sich beispielsweise in hypermobilen Ellenbogen-Gelenken äußert; die schmerzhafte Arthrose schränkt die Beweglichkeit der Gelenke allerdings stark ein. In Röntgenaufnahmen zeigen sich bei PSACH verbreiterte Metaphysen und deformierte, verkleinerte und teilweise fragmentierte Epiphysen. Die Röhrenknochen sind verkürzt und der Gelenkspalt erweitert, die Wirbel zeigen Deformationen. Die Veränderungen bei MED ähneln stark denen von PSACH, allerdings sind gewöhnlich weder Wirbel noch Metaphysen betroffen. Bei beiden Erkrankungen ist vor allem das Wachstum und die Verknöcherung der Röhrenknochen verzögert. Da die betroffenen Personen nach der Geburt normal erscheinen, wird die Erstdiagnose aufgrund der Wachstumsretardation selten vor dem zweiten Lebensjahr gestellt (International Working Group on Constitutional Diseases of Bone, 1998).

Die klinischen Krankheitsbilder von Pseudoachondroplasie und Multipler Epiphysärer Dysplasie sind heterogen und überlappen sich teilweise; dabei stellt MED vom *Fairbank*-Typ die mildesten, MED des *Ribbing*-Typs die mittelschweren und PSACH die mittelschweren bis schwersten Formen des Krankheitspektrums dar (Langer *et al.*, 1993; Spranger, 1976). Bei PSACH und MED zeigen die proliferierenden und hypertrophen Chondrocyten in der Wachstumszone des Knorpels eine teilweise Unterbrechung und Störung ihrer normalerweise säulenförmigen Anordnung; auch eine verminderte Zelldichte wurde beobachtet (Stanescu *et al.*, 1993; Stanescu *et al.*, 1982a; einen Überblick bietet: Stevens, 1999). Im elektronenmikroskopischen Bild von PSACH/MED-Chondrocyten lassen sich große, lamelläre bis granuläre Einlagerungen im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) erkennen (Abb. 1) (Maddox *et al.*, 1997; Maynard *et al.*, 1972; Stanescu *et al.*, 1993; Stanescu *et al.*, 1982a; Stanescu *et al.*, 1982b). Diese eigentümlichen Strukturen wurden nur im Knorpelgewebe beobachtet; sie enthalten kein Kollagen II, aber Aggrecan, COMP und Kollagen IX (Maddox *et al.*, 1997; Stanescu *et al.*, 1993; Stanescu *et al.*, 1982a; Stanescu *et al.*, 1982b), alles charakteristische Bestandteile der extrazellulären Knorpelmatrix. Delot *et al.* untersuchten Knorpelgewebe von PSACH-Patienten und fanden neben einer starken Reaktivität mit den lamellären rER-Ablagerungen, auch eine sehr schwache extrazelluläre Färbung mit dem anti-COMP-Antikörper. Sie interpretierten diesen Befund als eine extrem reduzierte COMP-Sekretion, die aber *in vivo* nicht zur vollkommenen Abwesenheit von COMP in der ECM des Knorpels führt (Delot *et al.*, 1998).

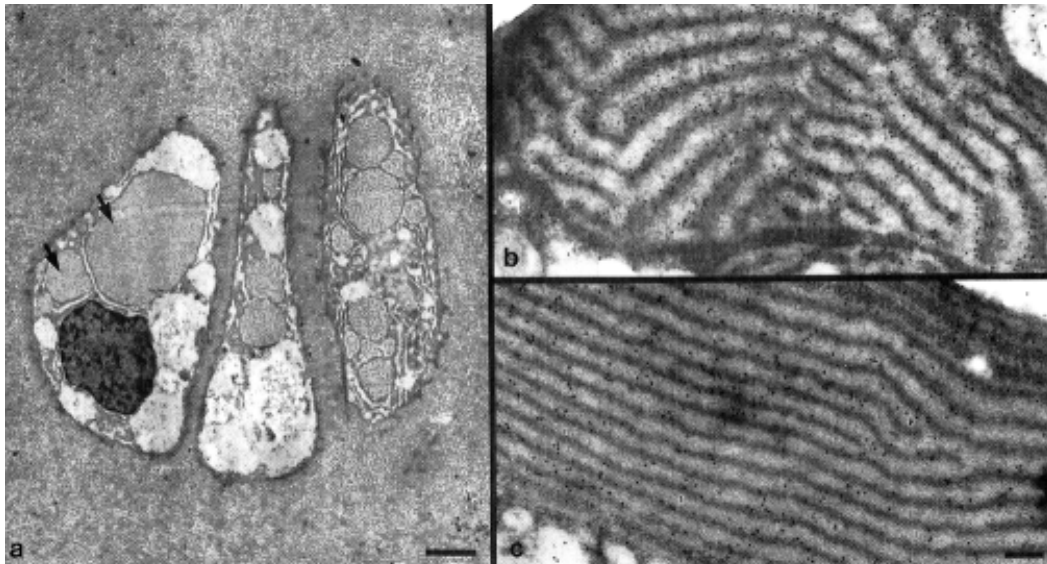


Abb. 1: Ultrastruktur und Lokalisation von COMP und Kollagen IX in PSACH-Chondrocyten. Die charakteristischen lamellären Einlagerungen im rER von Chondrocyten der Wachstumszone (a) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Gold-markierte Antikörper gegen COMP (b) und Kollagen IX (c) binden an Bestandteile der lamellären Strukturen. Der Balken entspricht 2µm (a) bzw. 200nm (b, c). (Photos aus: Maddox *et al.*, 1997)

1.2 Mutierte COMP- und Kollagen IX-Gene verursachen PSACH und MED

Durch genetische Analysen wurde der Locus für PSACH und MED (EDM1) beim Menschen auf Chromosom 19 identifiziert und konnte dem Gen für das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) zugeordnet werden (Briggs *et al.*, 1995; Hecht *et al.*, 1995); mittlerweile wurden 50 verschiedene COMP-Mutationen identifiziert, die PSACH oder MED verursachen (Abb. 2 und Anhang, Tabelle 7.1) (Ballo *et al.*, 1997; Briggs *et al.*, 1995; Briggs *et al.*, 1998; Cohn *et al.*, 1996; Deere *et al.*, 1998; Deere *et al.*, 1999; Delot *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 1995; Ikegawa *et al.*, 1998; Loughlin *et al.*, 1998; Maddox *et al.*, 1997; Susic *et al.*, 1998; Susic *et al.*, 1997); bis auf vier Mutationen in der carboxyterminalen Domäne betreffen alle übrigen den Bereich der Ca^{2+} -bindenden Typ 3-Domäne. Dabei sind in den meisten Fällen (29/50 \approx 60%) Aspartate betroffen, die wahrscheinlich an der Koordination von Ca^{2+} -Ionen beteiligt sind (s.u.). In fünf Fällen sind Cysteine betroffen, wodurch Disulfidbrücken verhindert oder unphysiologische Disulfide gebildet werden; beides kann die Struktur massiv beeinflussen. Bei weiteren fünf Mutationen handelt es sich um Deletionen oder Insertionen von mindestens zwei Aminosäuren, wodurch ebenfalls die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur massiv beeinflusst werden kann. Mutierte Exon/Intron-Übergänge, eine Verschiebung des Leserasters oder vorzeitige Stop-Codons, also Mutationen, die zum Verlust größerer Bereiche im reifen COMP führen können, wurden bisher bei PSACH oder MED nicht entdeckt.

Die Ursachen für die Entstehung von MED sind heterogener als bei PSACH: Neben Mutationen im COMP-Gen (EDM1) wurden auch mutierte Kollagen IX-Gene entdeckt; die Kollagen IX-Mutationen werden unter 1.5 ausführlich diskutiert. Zu PSACH und MED bietet die Datenbank OMIM ('On-Line Mendelian Inheritance in Man') einen Überblick (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>).

Die normale Entwicklung von transgenen Mäusen mit inaktiviertem COMP-Gen zeigt, daß nicht die Abwesenheit des Proteins COMP, sondern daß es seine Mutationen sind, die den PSACH bzw. MED-Phänotyp hervorrufen (L. Svensson und Å. Oldberg, persönliche Mitteilung; unveröffentlichte Beobachtungen von J. Hecht, zitiert nach: Stevens, 1999). Bisher ist unklar, ob mutiertes COMP in gleichem Maße wie der Wildtyp sekretiert wird. Vermutlich dominieren bei PSACH- und MED-Individuen *in vivo* gemischte Pentamere: Bei gleicher Transkriptions- und Translationseffizienz beider Allele entstehen $0,5^5 = 3,1\%$ Wildtyp-Pentamere und 96,9% Pentamere mit mindestens einer mutierten Untereinheit.

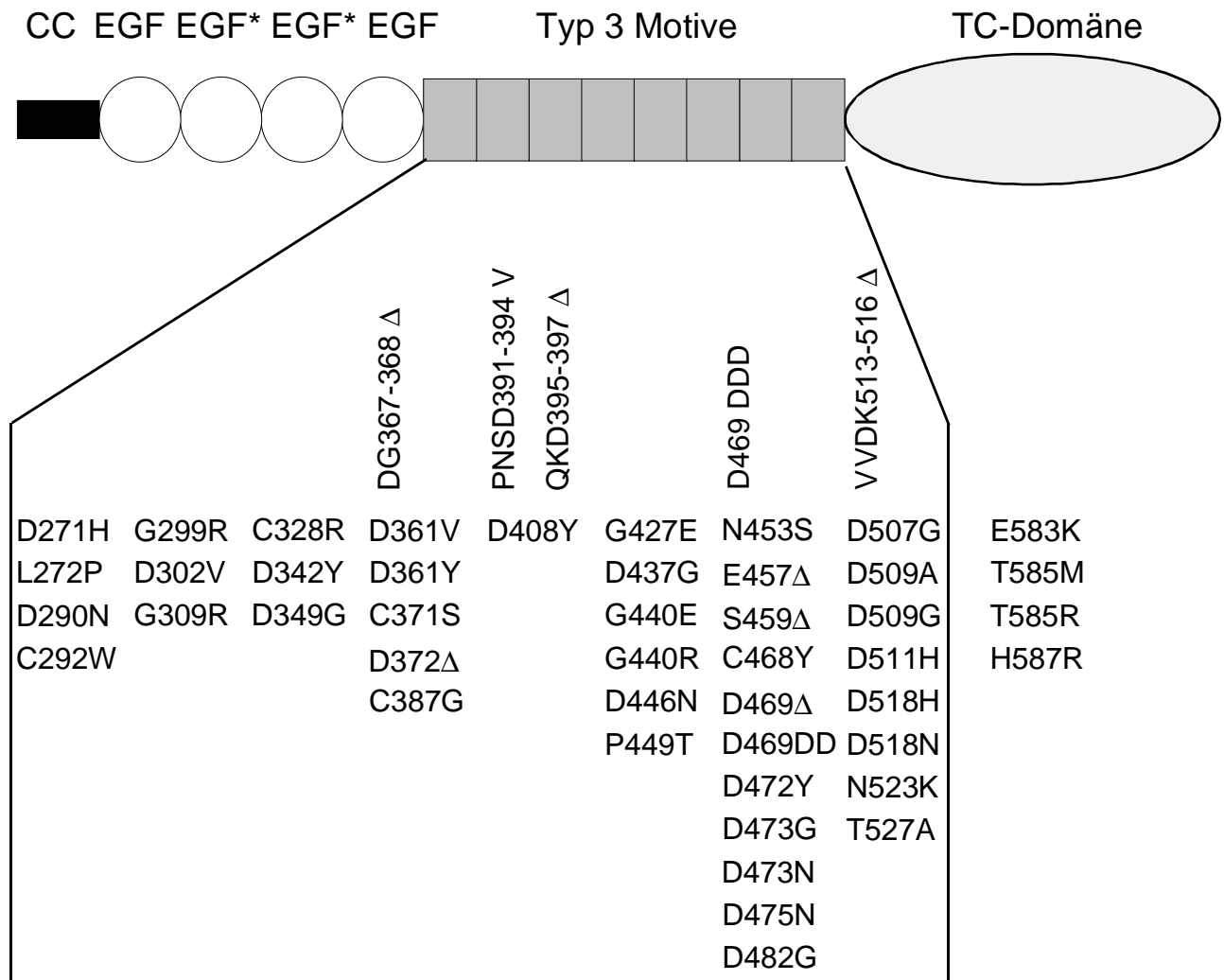


Abb. 2: Domänenaufbau von COMP und Lokalisation der Mutationen, die PSACH oder MED verursachen.
 Bezeichnungen: CC = Pentamerisierungsdomäne (*coiled coil*); EGF = EGF-ähnliche Domäne, EGF* = EGF-ähnliche Domäne mit vermuteter Calciumbindungsfähigkeit; Typ 3 Motive = Sequenzmotiv, dessen achtfache Wiederholung die Thrombospondin-typische, Ca^{2+} -bindende Typ 3 Domäne aufbaut; TC-Domäne = carboxyterminale Domäne.
 Kennzeichnung der Mutationen: Vertikal = Deletionen oder Insertionen von mindestens zwei Aminosäuren; horizontal (untereinander) = Mutationen einzelner Aminosäuren. Δ steht für Deletion, ∇ bedeutet Insertion.

1.3 Das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)

COMP ist ein homopentameres Glykoprotein der Extrazellulärmatrix von Knorpel, Sehnen und Bändern. Erstmals aus Rattenchondrosarkom-Gewebe und bovinem Trachealknorpel isoliert, wurde seine Sequenz aus einer Ratten cDNA-Bank zugänglich (Hedbom *et al.*, 1992; Mörgelin *et al.*, 1992; Oldberg *et al.*, 1992). Die monomere COMP-Untereinheit umfasst ohne Signalpeptid bei den verschiedenen Spezies ~740 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von ~82 kDa (Sequenzkarte: Anhang, 7.2), und das Molekulargewicht des Pentamers beträgt 524 kDa, bestimmt durch Gleichgewichts-Zentrifugation (Hedbom *et al.*, 1992). Sequenzvergleiche identifizieren COMP als Mitglied der Thrombospondin- (TSP-) Familie. Allen TSPs gemeinsam ist eine Oligomerisierungsdomäne, drei oder vier EGF-Domänen, acht Ca^{2+} -bindende Typ 3-Motive und carboxyterminal eine für die TSPs einzigartige TC-Domäne (Sequenzvergleich: Anhang, 7.3).

Das reife COMP ohne Signalpeptid besitzt aminoterminal eine 46 AS lange α -helikale Pentamerisierungsdomäne (PD oder CC), die zwischen den pentameren Thrombospondinen TSP3, TSP4 und COMP hoch konserviert ist. In der Sequenz finden sich charakteristische 'Heptad'-Wiederholungen der Struktur (a-b-c-d-e-f-g): In jeder dritten bis vierten Position (a und d) befindet sich eine hydrophobe Seitengruppe (vgl. Anhang: 7.4), in Position e und g liegen polare Aminosäuren. Fünf dieser α -Helices bilden linksgängig umeinandergewunden eine superspiralisierte α -Helix (*coiled coil*), dabei stehen die hydrophoben Reste a und d zur Achse des Bündels hin nach innen und sind etwas versetzt übereinander positioniert. Die intermolekularen Wechselwirkungen der Seitengruppen in Position 'a' und 'd' (hydrophobe Interaktionen) und in Position 'e' und 'g' (ionische Interaktionen) tragen zur Ausbildung und Stabilisierung der superspiralisierten Helix bei; zusätzlich bilden die Glutamine (bei Maus-COMP: Glutamat) in Position 'd' des vierten Heptad einen intermolekularen Ring von Wasserstoffbrückenbindungen. Nach Pentamerisierung fixiert ein Ring intermolekularer Disulfidbrücken zwischen Cys68 und Cys71 von benachbarten Ketten die Helix (Efimov *et al.*, 1996; Malashkevich *et al.*, 1996).

Die Pentamerisierungsdomäne ist über ein kurzes, wenig konserviertes Zwischenstück von 16 AS mit vier unmittelbar aufeinanderfolgenden EGF-ähnlichen Domänen verbunden (als EGF- oder EG-Domänen bezeichnet und zusammen ~180 AS umfassend), benannt nach dem epidermalen Wachstumsfaktor, in dem diese verbreiteten Strukturelemente erstmals beschrieben wurden. Legt man die Strukturmessungen einer EGF-Domäne von humanem Faktor IX zugrunde (Baron *et al.*, 1992), sollten die EGF-Domänen kompakt und globulär sein (Durchmesser ~3nm). Sie bestehen aus fünf kurzen β -Faltblättern und werden von drei Disulfidbrücken stabilisiert. Die zweite und dritte EGF-Domäne tragen vor ihrem ersten Cystein die Konsensussequenz D/N - x - D/N - E/Q (x = hydrophob), was ihnen Ca^{2+} -bindende Eigenschaften verleiht. Die EGF-Domänen von COMP erfüllen wahrscheinlich strukturelle Aufgaben.

An die EGF-Domänen schließt sich die Typ 3 Domäne an, die unter 1.4 eingehend beschrieben wird.

Den Aminoterminus von COMP bildet die globuläre TC Domäne (~240 AS), die nur in COMP und den eng verwandten TSP1-4 vorkommt. Die hohe Sequenzhomologie deutet auf eine Funktion hin, deren Struktur sich unter evolutionärem Druck nur wenig verändern konnte. COMP bindet über diese Domäne an

tripelhelikales Kollagen (vorliegende Arbeit; Rosenberg *et al.*, 1998); andere Funktionen der TC-Domäne sind unbekannt, ebenso unbeantwortet ist die Frage, welche Funktion COMP im Knorpel ausübt.

Die elektronenmikroskopisch bestimmte Quartärstruktur von bovinem COMP zeigt, daß die Oligomerisierungsdomäne einen Zylinder von 7,7nm Länge und 3,3nm Durchmesser bildet. Die vier EGF- und die Typ 3 Domäne sind von stabförmiger Gestalt (25,6nm x 1,2nm). Die globuläre TC-Domäne hat einen Durchmesser von 4,8nm (Mörgelin *et al.*, 1992). Legt man einer EGF-Domäne eine globuläre Struktur von 3nm Durchmesser zugrunde (s.o.), bleibt für die Typ 3 Domäne eine Länge von 13,6nm.

COMP ist N-glycosyliert und trägt vor allem Galactosamin, Glucuronsäure, Glucosamin und Galactose; obwohl chemische Analysen auf die Existenz von Chondroitinsulfat hinwiesen, konnte dies weder durch Chondroitinase-Behandlung, noch massenspektrometrisch verifiziert werden. Die chemischen und massenspektroskopischen Analysen von humanem und bovinem COMP ergaben, daß es nicht O-glycosyliert ist, kein Keratansulfat, aber ein ~1847Da großes Oligosaccharid vom Mannose-reichen Typ an Asn101 (1. EGF-Domäne) trägt; Asn-124 (2. EGF-Domäne) ist nicht glycosyliert, und Asn-721 (TC-Domäne) ist mit einer ~1724Da schweren Zuckerstruktur verbunden. (Hedbom *et al.*, 1992; Zaia *et al.*, 1997).

1.4 Die Typ 3 Domäne von COMP

Die Typ 3 Domäne (~260 AS) enthält sehr viel Aspartat, Glutamat, Asparagin und Glutamin und reagiert sehr sauer: Mit der Primärsequenz der Typ 3 Domäne errechnet sich ein theoretischer $p_I = 3,9$. Lawler bzw. Misenheimer ordneten die 13 Ca^{2+} -Bindungsmotive in acht Typ 3 Motiven an (*type 3 repeats*) (vgl. Abb. 4 und Anhang: 7.5) und postulierten aufgrund der Homologie zur Ca^{2+} -Bindungsstelle der EF-Hand die Fähigkeit zur Calciumbindung (Lawler und Hynes, 1986; Misenheimer und Mosher, 1995). Die Ca^{2+} -Bindungsstelle der EF-Hand ist in einer Schlaufe lokalisiert, die von zwei α -Helices flankiert wird ('*helix-loop-helix*'), hingegen fehlt in COMP diese charakteristische Struktur und die Typ 3 Motive sind einfach aneinandergereiht. In der EF-Hand wird das Ca^{2+} -Ion folgendermaßen koordiniert (Abb. 3):

In Position X befindet sich ein Asp und in Position Y und Z liegen Asp, Gln oder Ser. Die Position -Y nimmt der α -Carbonylsauerstoff einer beliebigen Aminosäure ein und Position -X wird häufig von einem Wassermolekül, sonst von dem Sauerstoff einer Aminosäure-Seitenkette eingenommen. Ein Glu in Position -Z trägt mit beiden Carboxyl-Sauerstoffen zur Calciumbindung bei. Zwischen den Positionen Z und -Y befindet sich meist ein Gly (zur Übersicht: Maurer und Hohenester, 1997; Maurer *et al.*, 1996).

Überträgt man die Positionen der Ca^{2+} -koordinierenden Aminosäuren in der EF-Hand auf die Sequenz der Typ 3 Motive, kann man ein Modell linear hintereinander angeordneter Bindungsstellen aufstellen (Abb. 4). Da etwa 60% der beschriebenen PSACH- und MED-assoziierten Mutationen Aspartatreste betreffen, die zur Ca^{2+} -Koordination beitragen könnten, wird eine bei mutiertem COMP veränderte Ca^{2+} -Bindung und Struktur als eine Ursache für die Krankheit diskutiert.

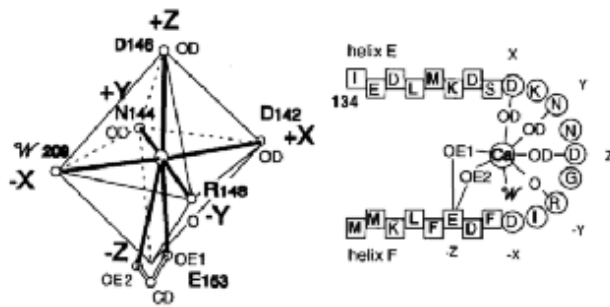
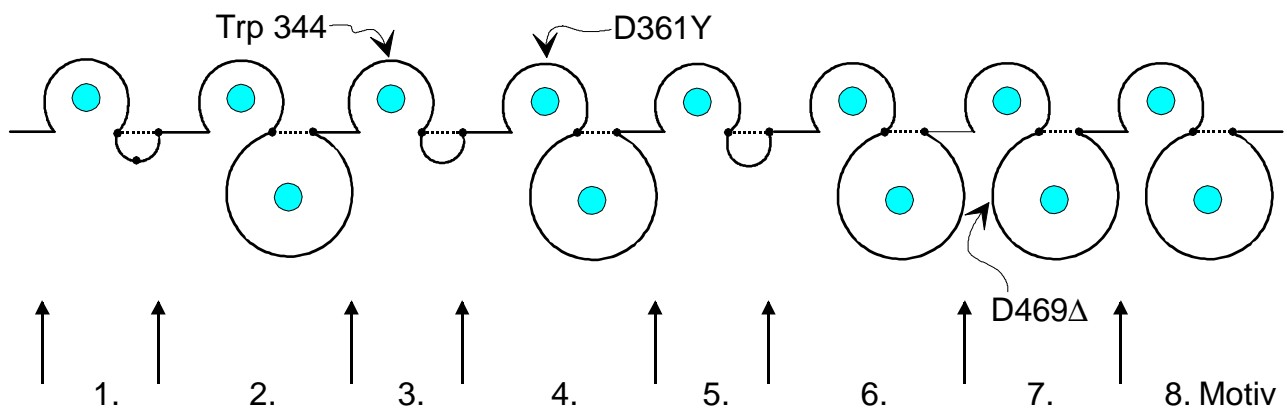


Abb. 3: Die Ca²⁺-Bindungsstelle der vierten EF-Hand von Troponin C. Links: Das zentrale Ca²⁺-Ion ist in einer pentagonalen Bi-Pyramide koordiniert. Rechts: Sequenz der Ca²⁺-Bindungsstelle in der Schleife der EF-Hand. Die Bezeichnung der Positionen im Konsensus sind außen dargestellt; an der Helix beteiligte Aminosäuren sind in Quadraten, an der Schleife beteiligte in Kreisen dargestellt. (aus: Zhou *et al.*, 1997).



EF-Hand-Konsensus	X	*	Y	*	Z	G	-Y	*	-X	*	*	-Z
1. Typ 3 Motiv	D	T	D	L	D	G	F	P	D	E	K	L
2. Typ 3 Motiv	D	V	D	R	D	G	I	G	D	A	C	D
3. Typ 3 Motiv	N	S	D	K	D	K	W	G	D	A	C	D
4. Typ 3 Motiv	D	T	D	R	D	G	Q	G	D	A	C	D
5. Typ 3 Motiv	D	S	D	G	D	G	V	G	D	A	C	D
6. Typ 3 Motiv	D	V	D	H	D	F	V	G	D	A	C	D
7. Typ 3 Motiv	D	S	D	H	D	G	K	G	D	A	C	D
8. Typ 3 Motiv	D	N	D	R	D	G	V	G	D	A	C	Q

Abb. 4: Modellhafte Anordnung der 13 vermuteten Ca²⁺-Bindungsstellen in acht Typ 3 Motiven. Oben: Die Ca²⁺-Bindungsstellen (große, schleifenförmige Kreise) sind mit Ca²⁺-Ionen (grau ausgefüllte Kreise) besetzt; die Cysteine (ausgefüllte Punkte) stabilisieren die Struktur durch Disulfidbrücken (gestrichelt). Die Position des fluoreszierenden Tryptophans (W344), die eingeführten Mutationen und die hypothetischen Grenzen (vertikale Pfeile) der Typ 3 Motive mit ihrer Numerierung sind eingezeichnet. Unten: Die putativen Ca²⁺-Bindungsstellen sind nach ihrer Sequenzhomologie in acht Typ 3 Motiven gruppiert; Sterne: beliebige Aminosäure (modifiziert, nach: Lawler *et al.*, 1986; Misenheimer und Mosher, 1995; Chen *et al.*, 2000).

1.5 Die Extrazellulärmatrix des Knorpels

Die extrazelluläre Matrix (ECM) des hyalinen Knorpels enthält hauptsächlich kollagene Proteine (Kollagen II, IX und XI; perizellulär auch Kollagen VI), Glycosaminoglykane und Proteoglykane (Aggrecan, Biglycan, Decorin, Fibromodulin), sowie nichtkollagene Proteine (COMP, Thrombospondin 1, Matrilin 1, Matrilin 3); ubiquitär vorkommende Proteine wie Fibronectin seien hier unberücksichtigt.

Die Kollagene II, IX und XI bilden ein fibrilläres Kollagengerüst, in dem die Chondrocyten und weitere ECM-Bestandteile wie die Proteoglykane verankert sind. Aus der hohen negativen Ladungsdichte der Glycosaminoglykane resultiert ein hoher osmotischer Quell- bzw. Schwelldruck. Die Kollagenfibrillen widerstehen dem Druck der eingeschlossenen Grundsubstanz, und bei Kompression des Knorpels wird nur ein geringer Teil des gebundenen Wassers aus dem Kollagen-Proteoglykan-Komplex gepresst. Dadurch steigt der osmotische Druck und baut die Rückstellkraft auf, damit bei Nachlassen des Drucks der Knorpel durch Wasseraufnahme seine ursprüngliche Form zurückerlangt. Der hyaline Knorpel ist also gleichzeitig steif und elastisch und erfüllt somit alle Voraussetzungen, um sowohl Druck- als auch Scherkräften zu widerstehen. Dies gilt insbesondere für das adulte Gelenk, dessen Knorpel gleichzeitig Bewegungen tolerieren und hohen Drücken widerstehen muss. (Eine Charakterisierung von ECM-Komponenten findet sich in: Ayad *et al.*, 1998; eine Übersicht über die Kollagene, speziell auch des Knorpels bieten: Bruckner und van der Rest, 1994; Cremer *et al.*, 1998; Hagg *et al.*, 1998; van der Rest und Garrone, 1991; zur Übersicht der Glycosaminoglykane: Ruoslahti, 1988). Die Ultrastruktur des Knorpels ist heterogen: Innerhalb desselben Gewebes finden sich je nach Bereich Kollagenfibrillen unterschiedlichen Durchmessers und Orientierung (Poole *et al.*, 1984), auch die Verteilung der interfibrillären Proteoglykane variiert (Poole *et al.*, 1982). Wahrscheinlich wird dieser supermolekulare Aufbau durch weitere Proteine und Proteoglykane gesteuert, beispielsweise Kollagen IX, Fibromodulin und Decorin (Hagg *et al.*, 1998).

Glycosaminoglykane

Im Knorpel ist eine aus Glycosaminoglykanen (GAGs) bestehende 'gelartige Grundsubstanz' in das Netzwerk der Kollagen-Fibrillen eingelagert. GAGs sind unverzweigte Polymere aus repetitiven Disaccharideinheiten und liegen an ein Protein gebunden als Proteoglykan vor; Hyaluronsäure (HA, Hyaluoronan) kommt als einziges GAG frei vor. In den Proteoglykanen sind die GAG-Ketten O-glycosidisch über ein charakteristisches Trisaccharid (Xyl-Gal-Gal) an Serin gebunden; nur Keratansulfat wird N- und O-glycosidisch mit Asparagin, Serin oder Threonin verknüpft. Die Disaccharideinheit der GAGs besteht aus einem Aminozucker (N-Acetyl-Glucosamin oder N-Acetyl-Galactosamin) und einer Zuckersäure (bei Keratansulfat: Galactose), die beide sulfatiert und/oder acetyliert sein können. Daraus resultiert eine hohe Dichte negativer Ladungen, was den GAGs Eigenschaften eines Kationenaustauschers verleiht; in der Tat scheinen auch überwiegend elektrostatische Wechselwirkungen für die Interaktion der GAGs mit anderen Proteinen verantwortlich zu sein. Nach Ladungsdichte geordnet ergibt sich folgende

Reihe: Heparin > Heparansulfat (HS), Dermatansulfat (DS) > Keratansulfat (KS) > Chondroitinsulfat (CS) > Hyaluronsäure (HA).

In Abhängigkeit von Gewebetyp und Entwicklungsstadium variieren Länge und chemische Eigenschaften der GAGs; vermutlich ist die zellspezifische Enzymausstattung des Golgi-Apparates die vorrangige Ursache dafür. Die Proteoglykane sind bezüglich ihrer Größe und des Protein-zu-GAG-Massenverhältnisses sehr heterogen (der folgende kurze Überblick basiert hauptsächlich auf: Ayad *et al.*, 1998; Ruoslahti, 1988).

Aggrecan ist das charakteristische und dominierende Proteoglykan des Knorpels (~10% des Trockengewichts!). Von seiner Gesamtmasse entfallen ~7% auf das Protein (220kDa), 87% auf CS und 6% auf KS. Aggrecan interagiert mit Hyaluronsäure: ~100 Aggrecan-Molekülen binden an eine Hyaluronsäure und bilden charakteristische riesige Komplexe. Die HA/Aggrecan-Bindung wird durch das **Link-Protein** stabilisiert. Eine vorzeitiges Stopcodon im Aggrecan-Gen verursacht bei der Maus den cmd-Phänotyp (*cartilage matrix deficiency*): Eine Chondrodysplasie mit Zwergwuchs und desorganisierter Wachstumszone des Knorpels. In der Knorpelmatrix von *cmd*-Mäusen sind neben Aggrecan weitere ECM-Komponenten in ihrer Synthese und Sekretion verändert (Wai *et al.*, 1998).

Biglycan (PG1), **Decorin** (PG2) und **Fibromodulin** sind strukturell eng verwandt und bilden die Gruppe der kleinen CS/DS-substituierten Proteoglykane, deren Proteinanteil aus Leucin-reichen Wiederholungen besteht. Biglycan ist das häufigste kleine Proteoglykan des Knorpels und trägt zwei GAGs. Es findet sich auch in anderen Geweben, beispielsweise zusammen mit Decorin in relativ großer Menge im mineralisierten Knochen. Decorin trägt nur eine CS/DS-Kette und kommt - abgesehen von Knorpel und Sehne - auch in vielen anderen Bindegewebstypen vor. Fibromodulin ist KS-substituiert und trägt sulfatierte Tyrosinreste; es wird in vielen Bindegeweben gebildet, besonders auch in Knorpel und Sehnen. Fibromodulin und Decorin binden an Kollagen I- und II-Fibrillen und beeinflussen *in vivo* das Wachstum der Kollagen-Fibrillen (Danielson *et al.*, 1997; Svensson *et al.*, 1999).

Kollagene

In den Fibrillen des Knorpels dominiert mengenmäßig das fibrilläre **Kollagen II**, das mit dem gleichfalls fibrillären Kollagen XI und dem FACIT (Fibrillen-assoziiertes Kollagen mit unterbrochener Tripelhelix) Kollagen IX ein Gerüst aus Kollagenfibrillen aufbaut und so vermutlich die dreidimensionale Organisation von anderen ECM-Bestandteilen und Zellen gewährleistet. Im Kollagen II werden extrazellulär aus Lysin- und Hydroxylysin-Resten kovalente, intra- und intermolekulare Querbrücken ausgebildet. Neben der Stabilisierung der Tripelhelices und Fibrillen werden dadurch auch Liganden an den Fibrillen fixiert,

beispielsweise ist die helicale COL2-Domäne von Kollagen IX kovalent mit den Telopeptiden von Kollagen II verknüpft. Kollagen II besitzt eine (verglichen mit anderen Kollagenen) überdurchschnittliche Glycosylierung der Hydroxylysine, die ihm einen besonders hydrophilen Charakter gibt. Auf die Beteiligung von Kollagen II-Mutationen an skeletalen Missbildungen wird hier nicht näher eingegangen.

Kollagen XI bildet durch Interaktion mit Kollagen II den Kern der Kollagenfibrillen (Bruckner und van der Rest, 1994). Der Kollagen XI-Aminoterminus steht von der Fibrillen-Längsachse ab und ragt je nach Durchmesser der Fibrillen mehr oder weniger weit heraus. Möglicherweise interagiert Kollagen XI über seinen Aminoterminus mit weiteren ECM-Molekülen.

Auf der Oberfläche der Fibrillen findet sich **Kollagen IX**, antiparallel orientiert zum Kollagen II. Aufgrund alternativer Promotoren weist die $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette im Knorpel aminoterminal eine globuläre, basische NC4-Domäne auf. Diese wird von der ~35nm langen COL3-Domäne 'auf Abstand' von der Fibrille gehalten (Abb. 5). Es gibt Hinweise, daß Kollagen IX die Kollagen II-reichen Fibrillen stabilisiert und Interaktionen vermittelt; die basische $\alpha 1(\text{IX})$ -NC4-Domäne könnte mit sauren GAGs, die Chondroitin-/Dermatansulfat-Kette der $\alpha 2(\text{IX})$ NC3-Domäne mit weiteren Komponenten der ECM wechselwirken (Bruckner und van der Rest, 1994; Bruckner *et al.*, 1985; Olsen, 1997; van der Rest *et al.*, 1990). Kollagen IX wird vor allem auf dünnen Kollagenfibrillen (bis ~20nm Durchmesser) des fötalen, unreifen Knorpels gefunden; diese Fibrillen bestehen zu ~80% aus Kollagen II und je ~10% aus Kollagen IX und XI. Im adulten, mechanischem Druck ausgesetzten Gelenkknorpel dominieren deutlich dickere Fibrillen (30-40nm), und hier trägt Kollagen IX nur 1-2% zum Gesamtkollagen bei. Zusammen mit weiteren Beobachtungen führte dies zu folgendem, von Hagg aufgestellten Modell der Kollagenfibrillen des adulten Gelenkknorpels (Hagg *et al.*, 1998): 'Dünne' Fibrillen (17-20nm Durchmesser) bestehen aus Kollagen II, IX und XI; Decorin liegt nicht fibrillenassoziiert vor. Die intermediären Fibrillen (bis 26nm) haben prinzipiell die gleiche Zusammensetzung, allerdings ist der Kollagen IX-Gehalt reduziert und in geringem Umfang ist Decorin nichtkovalent an die Fibrille gebunden. Die 'dicken' Kollagenfibrillen (26nm bis über 50nm Durchmesser) enthalten in hohem Maße Decorin, aber kein Kollagen IX oder XI; *in vivo* dient Decorin vermutlich wie auch Fibromodulin der Begrenzung des lateralen Fibrillenwachstums (s.o.), eine Funktion, die auch für Kollagen IX (Hagg *et al.*, 1998) diskutiert wird.

Die Beteiligung von Kollagen IX am Aufbau der ECM und seine Bedeutung für die strukturelle Integrität und Stabilität des Knorpels wird durch weitere Beobachtungen unterstützt: Transgene Mäuse, die im Knorpel eine Kollagen $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette mit einer großen Deletion (~80% der COL3-, die gesamte NC3-, und ~80% der COL2-Domäne) bilden, entwickeln milden Zwergwuchs und Arthrose, also MED-ähnliche Symptome (Nakata *et al.*, 1993). Das transgene Translationsprodukt destabilisiert durch den Wegfall eines Großteils der [Gly-X-Y]-Einheiten vermutlich die Kollagen-Heterotrimere, so daß ein dominant-negativer Funktionsverlust resultiert; auch Mäuse, deren $\alpha 1(\text{IX})$ -Kette kodierendes Gen rekombinant inaktiviert wurde, bilden kein Kollagen IX mehr und entwickeln Arthrose (Fässler *et al.*, 1994; Hagg *et al.*, 1997).

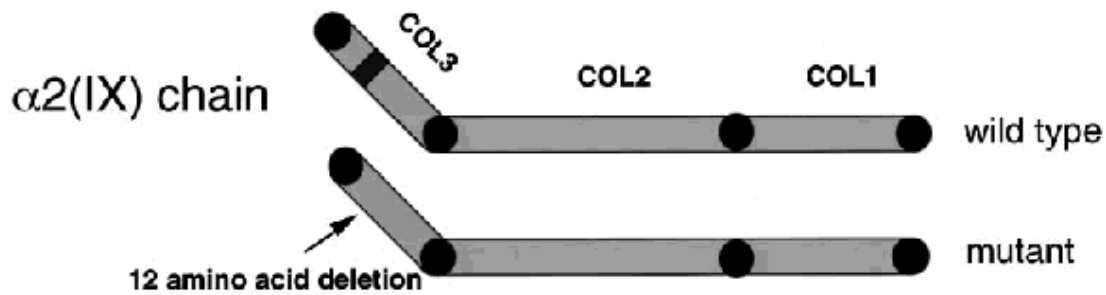


Abb. 5: Schematisch dargestellte Domänenorganisation der Kollagen $\alpha 2(\text{IX})$ -Kette und Lokalisation der Deletion, die MED verursacht. Bezeichnungen: COL1-COL3 = kollagene (tripelhelikale) Domänen 1-3; die nichtkollagenen Domänen NC1-NC4 sind hier als schwarz ausgefüllte Kreise dargestellt. (Abbildung aus: Spayde *et al.*, 2000).

In den Kollagen IX- $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Ketten kodierenden Genen (COLA2 bzw. COLA3) wurden Mutationen entdeckt, die MED (EDM2 bzw. EDM3) verursachen (Bönnemann *et al.*, 2000; Holden *et al.*, 1999; Lohiniva *et al.*, 2000; Muragaki *et al.*, 1996a; Paassilta *et al.*, 1999; Spayde *et al.*, 2000). In allen bisher publizierten Fällen führen mutierte Exon/Intron-Übergänge in den $\alpha 2$ - bzw. $\alpha 3$ -Ketten zum Verlust von Exon 3, wodurch die kollagene Domäne COL3 um zwölf Aminosäuren verkürzt wird (115 statt 137 AS), ohne daß sich das Leseraster dabei ändert. In mehreren Arbeiten wurden Hinweise auf eine Verringerung der $\alpha 2(\text{IX})$ -mRNA gefunden (Holden *et al.*, 1999; Spayde *et al.*, 2000) und über eine Strukturänderung der Kollagenketten spekuliert. Eine genaue Erklärung, wie die Deletion eines kleinen Bereichs der tripelhelikalen Domäne (12AS entsprechen 3,5 Umdrehungen der Einzelhelix) den MED-Phänotyp verursachen kann, steht noch aus.

Das **mikrofibrilläre Kollagen VI** unterscheidet sich in mancher Hinsicht von den vorgenannten: Es findet sich vorrangig in der unmittelbaren Umgebung der Chondrocyten (perizellulär), und nicht in der interterritorialen ECM, die im Knorpel den meisten Raum einnimmt. Kollagen VI besitzt nur eine relativ kurze tripelhelikale Domäne, aber große, globuläre, nichtkollagene Domänen an beiden Enden. Durch Interaktion der globulären mit den kollagenen Domänen entstehen intrazellulär durch antiparallele Zusammenlagerung Dimere, die extrazellulär Tetramere und daraus die Mikrofibrillen bilden. Diese Fibrillen besitzen ein perlschnurartiges Aussehen und bilden ein eigenständiges Netzwerk aus. Im Gegensatz zu den Lysin-Quervernetzungen der übrigen Kollagene werden Kollagen VI-Fibrillen durch Disulfid-Brücken stabilisiert.

1.6 Aufgabenstellung

Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit stand die Vorstellung, daß die Typ 3 Domäne von COMP aus aneinandergereihten Ca^{2+} -Bindungsstellen besteht, die dem Konsensus der Ca^{2+} -Bindungsstelle der EF-Hand entsprechen, aber eine vollkommen andersartige Struktur aufweisen. Zu diesem Zeitpunkt waren gerade Mutationen in COMP als Ursache der Pseudoachondroplasie und der Multiplen Epiphysären Dysplasie identifiziert worden; nur wenige, ausschließlich in der Typ 3 Domäne lokalisierte Mutationen waren bekannt, von denen ein Einfluss auf die Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit vermutet wurde.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, auf molekularer Ebene Zusammenhänge zwischen den entdeckten COMP-Mutationen und dem PSACH/MED-Phänotyp herzustellen und auf proteinbiochemischem Weg zu klären, wie Struktur und Funktion von COMP durch die Mutationen beeinflusst werden.

Dazu sollte untersucht werden, ob bzw. mit welcher Affinität die postulierten Ca^{2+} -Bindungsstellen in Wildtyp COMP Calcium binden und welche Struktur sie aufweisen. Die Auswirkungen von einigen ausgewählten, *in vivo* gefundenen Mutationen auf die Struktur und Funktion von COMP sollten durch Vergleich mit dem Wildtyp analysiert werden. Es war geplant, zu diesem Zweck pentameres Volllänge-COMP als Wildtyp und in mutierter Form, sowie trunkierte Formen von COMP rekombinant in Nierenzellen zu exprimieren und aufzureinigen. Diese Proteine sollten in erster Linie durch Gleichgewichtsdialyse und mit spektroskopischen Methoden (CD- und Fluoreszenzspektroskopie) untersucht werden. Wenn sich die rekombinanten Fragmente kristallisieren ließen, sollte eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden.

Im Laufe der Arbeit wurden neue COMP-Mutationen entdeckt, die teilweise auch innerhalb der TC-Domäne lokalisiert waren; Maddox *et al.* wiesen in den rER-Einschlüssen bei PSACH und MED neben COMP auch Kollagen IX nach; Kollagen IX-Mutationen wurden ihrerseits als Ursache für MED (EDM2, EDM3) identifiziert, und Rosenberg *et al.* zeigten für COMP eine von divalenten Kationen abhängige Kollagenbindung, die von der TC-Domäne vermittelt wird. Damit stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der mutationsbedingten Strukturänderung in der Ca^{2+} -bindenden Typ 3 Domäne, den Kollagen IX / COMP enthaltenden Ablagerungen im rER bei PSACH/MED-Chondrocyten und der Zn^{2+} -abhängigen Kollagen-Bindung besteht. Zur Klärung dieser funktionellen Aspekte sollte die Bindung der Pentamere von Wildtyp und Mutanten an Kollagen untersucht werden; dazu waren Festphasen-Bindungsexperimente durch SPR-Messungen, ELISA-artige Experimente und die elektronenoptische Untersuchung der COMP-Kollagen-Wechselwirkung durch *rotary shadowing* vorgesehen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Reagenzien, allgemeine Lösungen und Puffer

Alle Chemikalien hatten die Qualität p.a. und wurden von den Firmen Fluka, Merck, Serva und Sigma bezogen. Oligonukleotide wurden von MWG Biotech synthetisiert. Die Agarose stammte von Biozym und GibcoBRL, T4 DNA-Ligase und Restriktionsenzyme von den Firmen New England Biolabs und Fermentas. Die thermostabilen DNA-Polymerasen wurden von Perkin-Elmer (Taq) und Stratagene (Pfu), die Reagenzien für die AlfExpress Sequenzierung von Amersham Pharmacia Biotech geliefert. Zur Exposition der Chemolumineszenzreaktionen dienten Röntgenfilme des Typs 'Super RX' (Fuji). Zellkulturmedien, G418, Trypsin und Fötale Kälberserum (FCS) wurden von GibcoBRL bezogen. Soweit von Bedeutung, wird auf die Hersteller im Text gesondert verwiesen.

Bovines tCOMP wurde freundlicherweise von K. Rosenberg (Lund, Schweden) zur Verfügung gestellt; es wurde mit EDTA aus Rinderknorpel gereinigt (Rosenberg *et al.*, 1998).

Lösungen und Reaktionen wurden in hochreinem, deionisiertem Wasser angesetzt (Milli-Q PF Plus System, Millipore). Angaben des pH-Werts beziehen sich auf Raumtemperatur (22-25°C).

Hitzebeständige Lösungen und Plastikgegenstände wurden 40 min bei 121°C autoklaviert, Glas- und Metallgegenstände 6h bei 180°C sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch Zelluloseacetatfilter mit 0,22 µm Porenweite steriltfiltriert.

Azid	10% Natriumazid
PBS, pH 7,4 (Zellkultur)	140mM NaCl, 10mM KCl, 8mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
PMSF	500mM PMSF in Methanol
TAE	40mM Tris, 20mM Essigsäure, 1 mM EDTA
TBE	89mM Tris, 89mM Borsäure, 2mM EDTA; pH 8,0
TBS	150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7,4
TBS-T, für Immunoblot	150mM NaCl 50mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,1% Tween-20
TBS-T, für ELISA-artige Experimente	150mM NaCl 50mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,05% Tween-20
TE	10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8

2.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten

Nährmedium für Bakterien

LB Medium (Luria-Bertani Medium) und LB Agar wurde von GibcoBRL fertig gemischt bezogen und nach Angaben des Herstellers mit Wasser angesetzt. Nach Autoklavieren und Abkühlung auf ~50°C wurde gegebenenfalls Ampicillin ad 200µg/ml zugegeben.

Verwendete Bakterienstämme und Vektoren

Klonierungen wurden standardmäßig in *E. coli* Sure (Stratagene) oder DH5α transformiert. Das Plasmid pcDNA 3.1 Neo benötigte zur Selektion in *E. coli* das Co-Plasmid P3; daher wurde dieser Vektor in Bakterien des Stamms MC1061/P3 (Invitrogen) transformiert. Die Umklonierung der *in vitro* eingeführten Mutationen (s.u.) führte über eine nur nicht-methyliert nutzbare ClaI-Restriktionsenzymstichstelle; zu diesem Zweck wurde die entsprechende DNA in den methylierungsnegativen Bakterienstamm SCS110 (Stratagene) transformiert. Als Standard-Klonierungsvektor diente pUC18, einige Schritte wurden auch mit pBluescript KS(+) (Stratagene) durchgeführt. Die mutierte T3-cDNA wurde mit dem T/A-System in pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert. Zur eukaryotischen episomalen Expression diente der Vektor pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.*, 1997), ein Derivat des pCEP4 (Invitrogen).

Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Enzyme wurden im vom Hersteller mitgelieferten Puffer bei der empfohlenen Temperatur eingesetzt. Bei Einsatz von zwei Enzymen in einem Ansatz wurde ebenfalls nach Empfehlung des Herstellers verfahren. Typischerweise wurden ca. 2µg DNA mit 2-10U (Units) Enzym in 10µl mindestens 1h inkubiert. In präparativen Ansätzen wurden typischerweise 10-20µg DNA mit 10-20U in 40-100µl Gesamtvolumen über Nacht geschnitten.

Agarose-Gelelektrophorese

Standardmäßig wurden DNA-Gelelektrophoresen in TAE durchgeführt; DNA-Fragmente unter ~500bp wurden in TBE aufgetrennt, da das Separationsverhalten in diesem Puffer etwas besser ist. 0,7-2% Agarose (w/v) wurde bis zur Auflösung der Agarose in TAE oder TBE aufgeköcht, auf ~60°C abgekühlt und Ethidiumbromid ad 0,5 µg/ml zugegeben; verdampftes Wasser wurde ersetzt. Das Gel wurde in kombinierten Gieß- und Laufkammern gegossen, in denen auch die anschließende Elektrophorese stattfand. Die DNA-haltigen Proben wurden mit ~0,2 Vol 6xDNA-Probenpuffer gemischt und aufgetragen; die Elektrophorese wurde ungekühlt bei 4-8 Volt/cm durchgeführt und das Gel zur Dokumentation unter UV-Licht fotografiert.

6x (10x) DNA-Probenpuffer: 0,25% Bromphenol-Blau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 40% Glycerol (für 10x-Probenpuffer: 80%), 10mM EDTA (für 10x-Probenpuffer: 20mM).

Reinigung von PCR-Produkten und Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die PCR-Produkte oder die aus dem Gel herausgeschnittenen DNA-Banden wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), mit GeneClean (Bio101) oder mit dem NucleoSpin Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des jeweiligen Herstellers isoliert.

Dephosphorylierung von DNA

Zur Verringerung der Religationsfrequenz wurden die Enden der linearisierten Vektor-DNA mit SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) am 5'-Ende dephosphoryliert. Typischerweise wurde 1µg DNA mit 0,2-0,5U SAP in insgesamt 20µl behandelt; da das Enzym in den verwendeten Restriktionsenzym-puffern aktiv war, konnte auf einen speziellen Reaktionspuffer verzichtet werden. Nach 45-60 min bei 37°C wurde das Enzym hitzeinaktiviert (15 min 65°C).

Phosphorylierung von PCR-Produkten

Um amplifizierte DNA in linearisierte und dephosphorylierte Vektoren zu klonieren, wurden die PCR-Produkte gereinigt und mit T4-Polynukleotidkinase die 5'-Enden phosphoryliert. Typischerweise wurden ~0,5µg DNA mit 5U Enzym in insgesamt 20µl 1x T4-DNA-Ligasepuffer 1h bei 37°C inkubiert.

Ligation

Typischerweise wurden 10ng des Vektors, 25-50ng DNA-Fragment (~5x molarer Überschuss), 100-200 'NEB-Units' T4-DNA-Ligase in insgesamt 10µl 1xLigationspuffer des Herstellers bei 14-16°C über Nacht ligiert. Bei stumpfen Enden lag die verwendete Enzymkonzentrationen 10fach höher.

Transformation von Bakterien durch Hitzeschock und Ausplattierung

Ein Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Zu 100µl Bakteriensuspension wurden 2,5-5µl des Ligationsansatzes oder 1-2ng Plasmid gegeben, vorsichtig mit der Pipettenspitze verteilt und auf Eis gestellt; alle 5-10min wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig geschwenkt. Nach 30min bei 0-4°C wurde der Transformationsansatz exakt 45sec in das 42°C-Wasserbad getaucht, danach erneut 5min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1ml LB Medium wurden die Bakterien für 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, dann 100µl auf LB oder LB Agar mit 200µg/ml Ampicillin ausplattiert. Der Rest wurde durch Zentrifugation sedimentiert, in ~100-200µl LB aufgenommen und ebenfalls ausplattiert. Zur Blau/Weiß-Selektion mit dem lacZ-System wurden die Agarplatten vor dem Beimpfen mit je 70µl X-Gal (20mg/ml in Dimethylformamid) und IPTG (100mM) benetzt und kurz luftgetrocknet.

Herstellung kompetenter Bakterien (Protokoll von Clontech):

Eine Kolonie des *E. coli*-Stamms diente zur Inokulation von 100ml LB Medium. Nach 2,5-3,5h Schüttelinkubation bei 37°C war eine OD (600nm) von ~0,5 erreicht und die Zellen wurden auf Eis 20 min gekühlt. Die abzentrifugierten Bakterien (5min, 1200g, 4°C) wurden vorsichtig in 10 ml eiskaltem TSS resuspendiert, aliquotiert, in EtOH/Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TSS (10 ml): 8,5ml LB-Medium, 250µl 2M MgCl₂ (pH 6,5), 1g PEG 8000, 0,5ml DMSO

Der TSS-Puffer wurde durch einen 0,22µm Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Konservierung von Bakterien als Glycerolstock

3 Vol Bakteriensuspension (z.B. über Nacht gewachsene Kultur) wurden mit 1 Vol Einfriermix (80% Glycerin, 0,2mg/ml Ampicillin, 170mM NaCl; 0,22µm sterilfiltriert) gemischt und bei -80 °C eingefroren.

Plasmid-Präparationen

Die im folgenden beschriebenen Methoden zur Isolation von Plasmid-DNA entsprechen alle einer modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim.

‘MiniPrep’

1,5ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden bei RT abzentrifugiert (2 min, 8000g), das Sediment in 150µl P1 (100µg/ml RNase A, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl; pH 8,0) resuspendiert und 2-3 min auf Eis stehengelassen. Die Zugabe von 150µl P2 (1% SDS, 200mM NaOH) lysierte die Bakterien, nach maximal 5 min auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 150µl P3 (3M Kaliumacetat, 5M Essigsäure, pH 5,5) gestoppt. Nach 5 min auf Eis wurden die ausgefällten Proteine und genomische DNA durch 15 min Zentrifugation (20.000g, 4°C) sedimentiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 1ml EtOH ausgefällt, mit 70% EtOH gewaschen und in 30-50µl TE resuspendiert. Typischerweise betrug die Ausbeute 10-20µg DNA.

‘MidiPrep’

50-100ml einer Bakterienkultur, die sich in der Wachstumsphase befand, wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers mit QIAGEN-tip 100 Säulen (QIAGEN) oder NUCLEOBOND AX 100 Säulen (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

DNase-freie RNase A

RNase A (10mg/ml in 0,1M Na-Acetat pH 5,2) wurde 15 min auf 100°C erhitzt, um vorhandene DNAsen zu inaktivieren. Nach Abkühlen auf RT wurde der pH durch Zugabe von 1/10 Volumen 1M Tris-HCl (pH 7,4) erhöht, die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

DNA-Präzipitation mit EtOH

Zur Fällung wurde 1 Vol DNA mit 0,1 Vol 3M NaOAc, pH 5,2, und 2,5 Vol kaltem EtOH versetzt, mindestens 10 min auf Eis stehen gelassen und mindestens 15 min bei 4°C mit 17-21.000g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1ml 70% EtOH gewaschen, kurz zentrifugiert und nach Verwerfen der flüssigen Phase an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE oder 5mM Tris-HCl, pH 8, aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt; die Lagerung erfolgte bei -20°C.

PEG-Fällung zur Entfernung von Kontaminationen

DNA für Sequenzierungsreaktionen mit dem ALFexpress-System wurde mit PEG gefällt. Dazu wurden 100µl DNA mit 30µl PEG-Mix (20% PEG6000, 2,5M NaCl) versetzt, 1h auf Eis gestellt und 15 min bei 4°C mit 17-21000g zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde wie bei der EtOH-Präzipitation gewaschen und resuspendiert.

Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsabschätzung von Nukleinsäuren erfolgte durch Vergleich der Bandenintensitäten eines Aliquots und eines Standards bekannter Konzentration (z.B DNA-Größenmarker) nach Gelelektrophorese. Alternativ wurden Aliquots unbekannter Konzentration und DNA-Standards bekannter Konzentration auf Ethidiumbromid-haltige Agarose aufgetropft und unter UV-Licht die Fluoreszenzintensitäten nach Augenschein verglichen. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurden die gelösten Nukleinsäuren photometrisch vermessen. Bei durchschnittlicher Basenverteilung und 1cm Schichtdicke gilt bei 260nm: $\epsilon_{\text{dsDNA}} = 0,02\mu\text{g}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$. Das Verhältnis der OD260/OD280 beträgt für reine DNA $\geq 1,8$; die Absorption bei 320 nm wurde zur Korrektur der Küvettenstellung von den Messwerten abgezogen.

DNA-Sequenzierung

Die cDNA wurde entweder mit dem ALFexpress System (Amersham Pharmacia Biotech) oder durch 'cycle sequencing' mit einem ABIprism 377 DNA-Sequencer (Perkin-Elmer) sequenziert.

Für das ALFexpress System wurden die DNA-Sequenzierungsreaktionen mit dem Cy5 AutoRead Sequencing Kit ('Quick Annealing'-Protokoll) nach Angabe des Herstellers mit Cy5-markierten Sequenzierprimern oder nach Markierung von Primern mit Cy5-markiertem dATP ('Cy5 Labelling Mix') durchgeführt. Die Elektrophorese der Reaktionsansätze wurden auf einem ALFexpress System des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) vom ZMMK-Servicelabor durchgeführt.

Für das 'cycle sequencing' wurden 0,3-0,5µg Plasmid-DNA und 3,2pmol Primer in 10 µl Wasser gemischt; die Sequenzreaktion und die Elektrophorese wurden vom ZMMK-Servicelabor durchgeführt.

2.3 Klonierung der Wildtyp COMP cDNA-Fragmente

Die in dieser Arbeit konstruierten cDNA-Klone gehen auf einen Klon zurück, der die gesamte kodierende Sequenz von Ratten-COMP umfasst (Oldberg *et al.*, 1992). Diese cDNA lag kloniert im Expressionsvektor pcDNA1 Neo (Invitrogen) vor und wurde freundlicherweise von Å. Oldberg (Lund, Schweden) zur Verfügung gestellt. Mit entsprechenden DNA-Oligonukleotiden (Primern) wurden von dieser Vorlage in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) cDNA-Fragmente synthetisiert, die für die

Proteine unterschiedlichen Domänenaufbaus kodierten. Dabei wurden neue, singuläre Restriktionsenzym-schnittstellen in die PCR-Produkte eingeführt: Am 5'-Ende eine NheI- und am 3'-Ende eine NotI-Schnittstelle; vor der NotI-Sequenz wurde zusätzlich ein Stop-Codon generiert.

Die cDNA für rCOMP wurde mit Taq-Polymerase synthetisiert und die resultierenden Überhänge der PCR-Produkte mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Alle anderen cDNAs wurden aus Gründen der niedrigeren Fehlerrate mit einem Gemisch aus Pfu und Taq DNA-Polymerase durchgeführt, weshalb die Produkte stumpfe Enden aufwiesen. Die PCR-Produkte wurden in pUC18 (HincII) kloniert, das entstandene Bandenmuster nach Fragmentierung mit Restriktionsenzymen analysiert, und positive Klone sequenziert. Die fehlerfreien cDNAs wurden im Leseraster hinter das BM-40-Signalpeptid (NheI/NotI) in den Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.*, 1997) umkloniert und die flankierenden Bereiche der Übergänge noch einmal sequenziert. Die folgenden Aufstellung zeigt die eingesetzten Primer, die Länge der in den pCEP-Pu umklonierten cDNA und die Bezeichnung des kodierten COMP-Konstrukts. Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen der Klonierungsenzyme NheI/NotI, *kursiv* hervorgehoben ist das Stop-Codon vor der NotI-Sequenz.

rCOMP (gesamte Sequenz des Wildtyp Proteins außer dem Signalpeptid) ; PCR-Produkt: 2223 bp

Primer 1 5'-gccc gctagc ccagggccagatcccgc-3'

Primer M1 5'-caatgact gcggccgc c tag gcctccgcag-3'

mCOMP (es fehlt das Signalpeptid und die Oligomerisierungsdomäne) ; PCR-Produkt: 2016 bp

Primer 2 5'-gccc gctagc ctgcgcaccggctc-3' und Primer M1

EGF-T3 (4. EGF-Domäne und die acht Typ 3 Motive) ; PCR-Produkt: 909 bp

Primer 3 5'-gccc gctagc ccacttctgccccgacg-3'

Primer M2 5'-caatgact gcggccgc t tag gcgttctcggggcac-3'

T3 (umfasst nur die acht Typ 3 Motive) ; PCR-Produkt: 786 bp

Primer 4 5'-gccc gctagc ccgcgacacagacctgg-3' und Primer M2

T3-7x (umfasst das zweite bis achte Typ 3 Motiv) ; PCR-Produkt: 708 bp

Primer 5 5'-gccc gctagc cacggtgcccaattcagg-3' und Primer M2

Die PCR wurde in 100µl-Ansätzen in Pfu-Reaktionspuffer (10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris-HCl, pH 8,8, 2mM Mg SO₄, 0,1mg/ml BSA, 0,1% Triton X-100) mit 2U Pfu-Polymerase durchgeführt. Die rCOMP cDNA wurde analog amplifiziert, aber mit 2U Taq- **und** 2U Pfu-Polymerase.

PCR-Ansatz: 200µM von jedem dNTP, 2U Pfu-Polymerase oder [2U Pfu + 2U Taq], jeweils 200nM Primer, 20ng COMP cDNA

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und im RoboCycler Gradient 40 (Stratagene) mit dem folgenden Temperaturprofil amplifiziert: initiale Denaturierung: 2 min, 94°C // 12 Zyklen: 1 min 94°C / 30 sec 52°C / 3 min 72°C // terminale DNA-Synthese: 8 min 72°C //

2.4 *In vitro* Mutagenese der COMP cDNA

Die gezielte Mutagenese der Wildtyp COMP cDNA erfolgte durch Primer, die die mutierte Sequenz in Form von wenigen nichtkomplementären Nukleotiden enthielten (Abb. 6). Durch stille Mutationen wurden zusätzlich neue Restriktionsschnittstellen zur einfacheren Identifikation der rekombinanten Klone geschaffen: Die Mutagenese D361Y schuf eine neue Bst1107I (=SnaI)-Erkennungssequenz, bei D469Δ war es eine neue SphI-Schnittstelle, und bei D475N eine KpnI-Sequenz.

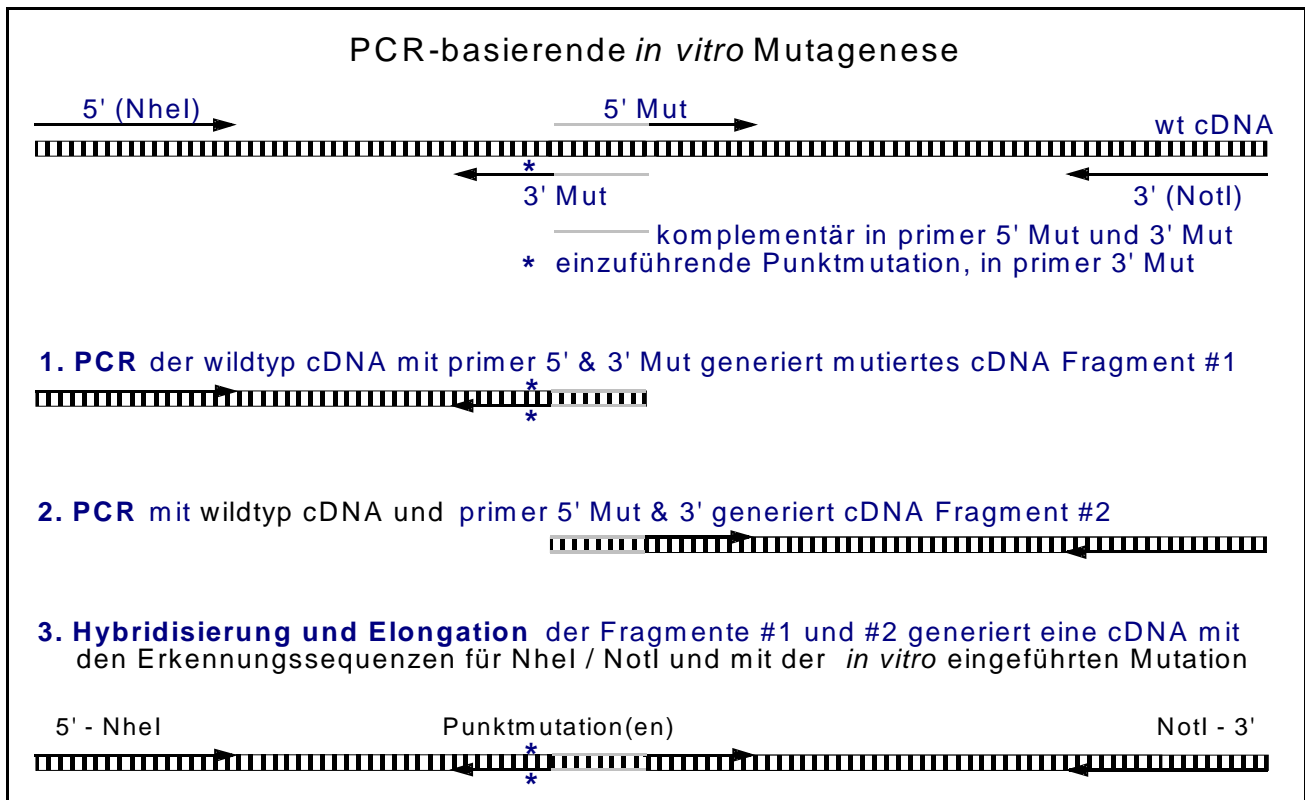


Abb. 6: Prinzip der PCR-basierenden *in vitro* Mutagenese der COMP cDNA. Mit den Primern 5' (NheI) und 3' Mut, der die Mutation enthielt, und mit den Primern 3' (NotI) und 5' Mut wurden in zwei getrennten Reaktionen durch PCR die Fragmente #1 und #2 amplifiziert und nach Elektrophorese isoliert. Da die Primer 3' Mut und 5' Mut in einem Teilbereich komplementär sind, hybridisierten die denaturierten Fragmente miteinander und wurden in einer dritten PCR mit 5' (NheI)- und 3' (NotI)-Primer amplifiziert, gereinigt und kloniert. Diese cDNA enthielt in der Mitte die Mutation und an den Enden die zur Klonierung in den pCEP-Pu nötigen NheI- und NotI-Erkennungssequenzen.

Die Mutagenese erfolgte mit einem Gemisch von Taq- und Pfu-Polymerase mit folgendem Temperaturprofil: Initiale Denaturierung - 2 min 94°C // 10 Zyklen - 1 min 94°C / 30 sec 52°C / 2 min 72°C // terminale DNA-Synthese - 15 min 72°C

Jeweils ~25% der gereinigten PCR-Produkte (in Abb. 6 als cDNA-Fragmente #1 und #2 bezeichnet) wurden anschließend in fünf Zyklen mit Taq DNA-Polymerase und den Primern #4 und M2 (in Abb. 6 als 5' (NheI) und 3' (NotI) bezeichnet) nochmals mit dem unter 2.3 angegebenen Temperaturprofil amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden entweder in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert, oder erst die 5'-Überhänge mit Pfu-Polymerase aufgefüllt und die 5'-Enden phosphoryliert, und dann in den HincII-linearisierten, dephosphorylierten Vektor pUC18 kloniert und sequenziert. Zur Klonierung der

Vollängekonstrukte wurden die mutierten T3 cDNAs in dam/dcm-negative *E. coli* SCS110 transformiert und anschließend die nichtmethylierten Plasmide präpariert. Ein etwa 500 bp großes ClaI/BstB1-Fragment enthielt die *in vitro* eingeführten Mutation und wurde in die gleichermaßen linearisierte rCOMP cDNA eingeführt. Damit waren die Mutation als T3- und als Vollänge-Konstrukte verfügbar und wurden in den Expressionsvektor pCEP-Pu umklont und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

Die folgenden Aufstellung zeigt die Namen des kodierten Proteins und die eingesetzten Primer. Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen der neu eingeführten Restriktionsenzymststellen, **fett** hervorgehoben die veränderten Nukleotide und *kursiv* die komplementären Bereiche der Primer-Paare:.

T3-D361Y: Punktmutation [gat] nach [tat] und Generation einer neuer Bst1 107I (= SnaI) Schnittstelle

5' Mut Primer	5'-gaccagaa <u>gtatac</u> agaccgggatg-3'
3' Mut Primer	5'-ggctc <u>gtatac</u> ttctggatcatc-3'

T3-D469Δ: Deletion eines [gac]- Triplets und Generation einer SphI Schnittstelle

5' Mut Primer	5'-ggatg <u>gcatgc</u> [ΔΔΔ] gatgacgacgac-3'
3' Mut Primer	5'-gtcgtcgtcatc [ΔΔΔ] <u>gcatgc</u> atcacccttg-3'

T3-D475N: Punktmutation [gac] nach [aac] und Einführung einer zusätzlichen KpnI Schnittstelle

5' Mut Primer	5'-gacaataacgg <u>ggtacc</u> tgacagc -3'
3' Mut Primer	5'-ctgtca <u>ggtacc</u> ccgtattgtcgtc-3'

2.5 Rekombinante Expression der COMP-Fragmente

Extrazelluläre Proteine werden fast ausnahmslos im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat posttranslational modifiziert. Zu den Modifikationen gehört die Reifung des Proteins durch Entfernen der Signalpeptide, die gezielte Bildung von Disulfidbrücken bzw. die Umlagerung unkorrekt ausgebildeter Cysteine, Glycosylierung und andere Prozesse, die auch noch nach Sekretion stattfinden können. Manche dieser Prozesse - beispielsweise die Glycosylierungsmuster - können gewebe- oder entwicklungsspezifisch reguliert werden. Bei COMP als pentamerem Multi-Domänen-Protein mit 45 Cysteinen und zwei N-Glykosylierungsstellen pro Untereinheit kann man vermuten, daß posttranslationale Modifikationen Voraussetzung zur Annahme der korrekten Struktur und zur Erfüllung der Funktion sind.

In dieser Arbeit wurden die Proteine in humanen embryonalen Nierenzellen (293-EBNA, Invitrogen) exprimiert. Der verwendete Expressionsvektor pCEP-Pu enthält den Replikationsstart *oriP* und kodiert für das *nuclear antigen* des Epstein Barr Virus (*EBNA-1*). Dieses virale Protein bindet an den *oriP* und ermöglicht in Primatenzellen die extrachromosomale Replikation einer großen Anzahl der Episomen in einer Zelle. Die Wirtszellen sind aufgrund ihrer Neomycin-Resistenz mit G418 (Geneticin) gegenüber anderen Zellen selektionierbar und exprimieren ebenfalls *EBNA-1*, wodurch nach Angaben von Invitrogen die Transfektionseffizienz im Vergleich zu 293-Zellen gesteigert ist.

Der Vektor pCEP-Pu repliziert bakteriell wegen seines *ColEI ori* und ist in Bakterien durch die Ampicillin-Resistenz, in 293-EBNA-Zellen durch die Puromycin-Resistenz selektionierbar. Die klonierte

cDNA wird unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors transkribiert und die mRNA dank des Polyadenylierungssignals von SV40 polyadenyliert. Das Signalpeptid von BM-40 dirigiert das Protein in das ER zur Sekretion.

2.5.1 Zellkultur von 293-EBNA Zellen

Die 293-EBNA Zellen wurden in 0,2ml/cm² DMEM/F-12, 10% FCS und 0,25mg/ml G418 adhären in Zellkulturschalen (10 und 15cm Durchmesser; Falcon) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂; alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt.

Konfluente Zellrasen wurden mit PBS gewaschen und die Zellen ~5 min bei 37°C mit 0,05 ml/cm² Trypsin/EDTA (50mg/ml Trypsin, 20mg/ml EDTA in PBS) vom Untergrund gelöst. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe des gleichen Volumens FCS-haltigen Mediums gestoppt, die Zellen resuspendiert und typischerweise auf sechs Schalen verteilt.

Zur Elektroporation wurden die suspendierten Zellen vorsichtig abzentrifugiert, einmal mit DMEM/F12 gewaschen und dann in wenigen ml serumfreien Mediums aufgenommen. Der Zelltitel wurde lichtmikroskopisch durch Auszählung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen vorsichtig in DMEM/F12 mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen und langsam auf -80°C abgekühlt; die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.5.2 Transfektion und Selektion der rekombinanten 293-EBNA Zellen und Ernte des serumfreien Kulturüberstandes

Die rekombinante DNA wurde durch Elektroporation in die 293-EBNA Zellen eingeschleust: In einer Elektroporationsküvette mit 0,4cm Elektrodenabstand (BioRad) wurden 5x10⁶ Zellen mit 3µg DNA in 800µl DMEM/F12-Medium und NaCl ad 25mM gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte die Elektroporation im Gene-Pulser II (BioRad) bei 230V mit 500µF; die Zeitkonstante τ lag um 5 msec (τ ist die Zeitdauer, in der die Kondensatorspannung auf 1/e ~37% der Anfangsspannung abgefallen ist und damit ein Maß für den Widerstand). Die rekombinanten Zellen wurden nach 5min in serumhaltigem Medium ausplattiert und nach 48h mit 1µg/ml Puromycin selektioniert; die Selektion war nach etwa 10-14 Tagen beendet. Die COMP sekretierenden Zellen wurden in serumhaltigem Medium vermehrt, bis 300-400ml Überstand pro Mediumwechsel geerntet werden konnte (bei ~0,18ml/cm²). Reste des FCS wurden mit PBS gewaschen, die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte danach in serumfreiem DMEM/F12 Medium in Gegenwart von 1µg/ml Puromycin. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt, die COMP-haltigen Überstände mit PMSF ad 0,5mM versetzt und bis zur Reinigung bei -20°C gelagert.

2.6 Allgemeine proteinchemische Arbeiten

Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen

Die Proteinlösung wurde mit 0,14 Vol 1% Triton X-100 gemischt und 0,25 Vol. 50% TCA zugegeben. Nach 10-20 min Inkubation auf Eis wurden die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation gesammelt (20.000g, 10 min, 4°C), 2x mit kaltem Aceton gewaschen, luftgetrocknet und in Puffer aufgenommen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

In dieser Arbeit wurden reduzierende und nichtreduzierende diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli eingesetzt, in der Regel als 'Minigel' (~10x8x0,15cm; ~5cm Trenn- und 2cm Sammelgel-Höhe). Hauptsächlich wurden lineare Gradienten von 3-10%, 4-12% und 4-15% Acrylamid (AA) und isokratische Trenngele mit 10%, 12% oder 15% AA gegossen (Trenngelpuffer: 125mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0,1% SDS, pH 8,8). Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels lag bei 3,5% oder 4% (Sammelgelpuffer: 375mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 6,8). Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid betrug 37,5:1; der Elektrophoresepuffer bestand aus 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 20 mM Tris.

Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt ad: 2% SDS, 10% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8; zur Reduktion wurde ~5% β -Mercaptoethanol (β -ME) zugesetzt. Die Proben wurden 20-30 min bei RT mit Probenpuffer inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (160V) oder konstantem Strom (15mA/Gel) unter Wasserkühlung mit dem Mighty Small II SE250 System durchgeführt (Amersham Pharmacia Biotech). Nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% MeOH, 10% HOAc fixiert und gefärbt (30min-16h) und mit 40% MeOH, 10% HOAc entfärbt (30min-3h). Die Schlußentfärbung erfolgte für 1-24h in 7% HOAc und wurde gegebenenfalls durch leichtes Erhitzen beschleunigt. Als Molekulargewichtsmarker dienten:

High Molecular Weight Marker (Roche Diagnostics; nur reduziert eingesetzt)

Myosin, 200 kDa // β -Galaktosidase, 116 kDa // Phosphorylase B, 97 kDa //

Rinderserumalbumin (BSA), 66 kDa // Aldolase, 39 kDa

Low Molecular Weight Marker (Amersham Pharmacia Biotech)

Phosphorylase B, 94 kDa // Serumalbumin, 67 kDa // Ovalbumin, 43 kDa //

Carboanhydrase, 30 kDa // Trypsin Inhibitor, 20 kDa // α -Lactalbumin, 14 kDa

gegebenenfalls wurde dem LMW dimeres Fibronectin zugegeben, nichtreduziert: ~500kDa

Elektrotransfer auf NC oder PVDF

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembran (Protran BA45, Schleicher & Schüll) transferiert. Sollten Proteinbanden N-terminal ansequenziert werden, wurde eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF, Millipore) eingesetzt.

Der Transfer erfolgte in Boratpuffer (50mM Borat, pH 8,5, 10% MeOH) für 2-3h, bei 4-8°C mit ~0,8-2 mA/cm² oder für 12-16h mit ~0,4mA/cm². Die NC-Membran wurde mit Ponceau S, die PVDF-Membran mit Coomassie gefärbt und die Position der Proteinmarker auf der Membran markiert.

Immunoblot und Chemolumineszenzdetektion

Die freie Bindungsstellen der NC-Membran wurden mit 0,5-2% Magermilchpulver (MMP) in TBS-T (TBS + 0,1% Tween-20) abgesättigt (1-2h RT oder 16h/4°C) und anschließend nach Vorschrift des ECL-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) gewaschen; Primär- und Sekundärantikörper wurden in 0,5-1% MMP/TBS-T für je ~1h auf die Membran gegeben. Die Detektion des Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers (2.pAb*HRP) erfolgte entweder gemäß der ECL-Vorschrift oder mit 'selbstgemachtem ECL' aus frisch angesetzten und unmittelbar einzusetzenden Lösungen A und B:

Lösung A: 5ml 0,1M Tris-HCl, pH 8,5 + 22µl 90mM p-Coumarinsäure + 50µl 250mM Luminol

Lösung B: 5ml 0,1M Tris-HCl, pH 8,5 + 3µl 30% H₂O₂

Detektion der Proteinglycosylierung

Die viscinalen Diole von Kohlenhydraten lassen sich mit Perjodessigsäure zu Aldehyden oxidieren und mit Biotin-aminocaproyl-hydrazid (BACH) zum Biotinderivat umsetzen. Die Biotinmarkierung läßt sich mit Streptavidin-gekoppelten Enzymen wie HRP (Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase) detektieren; der Nachweis ist spezifisch für Saccharide, aber unterscheidet nicht zwischen O- und N-Glykosylierung oder eventuell anhängenden Glycosaminoglykan-Ketten.

Die NC-Membran mit den fixierten Proteinen wurde mit PBS, pH 6,5, gewaschen (50mM K-phosphat, 150mM NaCl) und 20 min bei RT mit 10mM Natriummetaperjodat in 100mM NaOAc, pH 5,5, oxidiert. Der NC-Filter wurde 3x 10min in PBS, pH 6,5, gewaschen und die Biotinylierung mit 5µM BACH in 100mM NaOAc, pH 5,5, durchgeführt (1h, RT). Die NC-Membran wurde mit PBS oder TBS gewaschen und freie Bindungsstellen wie beschrieben mit MMP blockiert. Anschließend wurde die Membran 45 min mit [biotinyliertes Streptavidin]*HRP-Komplex inkubiert (1:4000 in TBS-T verdünnt; Amersham Pharmacia Biotech) und durch Chemolumineszenz nachgewiesen.

2.7 Chromatographische Reinigung des rekombinanten COMP

Alle Chromatographien wurden mit ≥ 50mM NaCl, gepuffert mit 50mM Tris-HCl und in Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors PMSF (0,5mM) bei 4-8°C durchgeführt; nur die finalen Ionenaustausch-Chromatographien fanden bei Raumtemperatur statt. Der pH-Wert der Puffer wurde bei der jeweiligen Arbeitstemperatur eingestellt; alle Lösungen wurden durch 0,22µm Zelluloseacetatfilter (Falcon) filtriert und dabei entgast. Zur Konzentration von Proteinlösungen dienten HiTrap Q Säulen (Matrix: ~34µm Partikel aus quervernetzter Agarose, ähnlich der Q Sepharose FastFlow), die mit 0,5 oder 1M NaCl eluiert wurden.

Die Puffer enthielten 20-25µM Ca^{2+} (Ca^{2+} -Gehalt von 'p.a.'-Reagenzien). Schließlich wurden die Proteine mit PD-10- (Sephadex G25) oder NICK-Säulen (Sephadex G50) in 5mM Tris-HCl, pH7,5, überführt; dieser Puffer war aus Reagenzien der Qualität 'Merck suprapur' angesetzt und enthielt ~5µM Ca^{2+} .

Die begrenzte Kapazität der Gelfiltrations- und Ionentauschersäulen erforderte mehrfach die Wiederholung von Reinigungsschritten, um alle relevanten Fraktionen des vorhergehenden Schrittes aufzuarbeiten. Da die wesentlichen Parameter gleich blieben, sind solche Repetitionen nicht ausdrücklich vermerkt. Die verwendeten Chromatographiematrizes und Leersäulen, die Chromatographiesysteme 'HiLoad' und 'FPLC' wurden von Amersham Pharmacia Biotech bezogen.

2.7.1 Anionenaustauschchromatographie des Zellkulturüberstands

Der pH-Wert der Zellkulturüberstände wurden nach dem Auftauen mit 1M Tris-HCl ad 25mM und pH 8,6 (Aufreinigung der Pentamere) oder pH 7,4 (Aufreinigung der übrigen Proteine) eingestellt. Die Lösung wurde nach Zugabe von PMSF ad 0,5mM und Natriumazid ad 0,1% durch ein 5cm hohes Gelbett aus Sephadex G25 filtriert, um Schwebstoffe zu entfernen. Im ersten Schritt diente Q Sepharose FastFlow, ein Anionentauscher mit grober Matrix (90µm große Partikel auf Basis quervernetzter Agarose, die quaternäre Amine trägt) zur Konzentration der Proteine aus dem Überstand auf der Säule; hierbei wurden gegebenenfalls Kontaminationen durch andere Proteine in Kauf genommen.

- > Matrix: 80-90ml Q Sepharose FastFlow, nach Vorschrift des Herstellers gepackt
- > Gelbett: 2,6cm Durchmesser ($A \sim 5,3\text{cm}^2$), ~16cm Gelbetthöhe in einer XK26/40 Säule
- > Equilibrierung der Säule mit 200ml Puffer A:
50mM NaCl, 0,5mM PMSF, 0,1% Azid, 50mM Tris-HCl, pH 7,4 bzw. 8,6 (s.o.)
- > Auftrag von 900-1400ml Zellkulturüberstand (1,8-2,4 ml/min); Sammeln des Durchlaufs
- > Waschen der Säule mit 150-200ml Puffer A (1ml/min); Sammeln von 10ml-Fraktionen
- > Gradientenelution mit Puffer A und Puffer B (1M NaCl, sonst wie Puffer A) (1ml/min);
50-500mM NaCl in 250ml (0-250ml)
500-1000mM NaCl in 100ml (250-350ml); Sammeln von 10ml-Fraktionen
- > Regeneration der Säulenmatrix mit 200ml Puffer B und 300-400ml Puffer A

Der Durchlauf und die Eluate der Ionenaustausch-Chromatographie wurde durch SDS-PAGE analysiert; Fraktionen mit hoher COMP-Konzentration bei akzeptabler Kontamination durch andere Proteine wurden vereinigt; der nächste Aufreinigungsschritt erfolgte durch Gelfiltration.

2.7.2 Gelfiltration der pentameren Proteine und von mCOMP

Die eigentliche Reinigung der pentameren Proteine und des monomeren mCOMP wurde durch Gelfiltration der Ionenaustauscher-Eluate mit Sepharose CL-6B, einer quervernetzten Agarose, erreicht:

- > Matrix: 1800ml Sepharose CL-6B, nach Vorschrift des Herstellers mit 1,5ml/min gepackt
- > Gelbett: 5cm Durchmesser ($A \sim 19,6\text{cm}^2$), ~90cm Gelbetthöhe in einer XK50/100 Säule
- > Equilibrierung (1ml/min) mit 3,5l Puffer GF:
50mM NaCl, 0,5mM PMSF, 0,1% Azid, 50mM Tris-HCl, pH 8,6
- > Auftrag von 30-100ml der vereinigten Ionenaustauscher-Eluate mit 1ml/min
- > Elution (1ml/min) mit Puffer GF; Sammeln von 15ml-Fractionen

Die Eluate wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

2.7.3 Gelfiltration der Proteine EGF-T3, T3 und der T3-Mutanten

Die Gelfiltration der kleineren Proteine erfolgte mit Sephadex G75; diese Matrix basiert auf quervernetztem Dextran und ist erheblich druckempfindlicher als Sepharose CL-6B.

- > Matrix: 2000ml Sephadex G75 superfine, mit 1,35ml/min gepackt
- > Gelbett: 5cm Durchmesser ($A \sim 19,6\text{cm}^2$), ~100cm Gelbetthöhe in einer XK50/100 Säule
- > Equilibrierung (1-1,3ml/min) mit 3l Puffer GF (s.o.)
- > Auftrag von 50-70ml der vereinigten Ionenaustausch-Chromatographie-Eluate (0,6ml/min)
- > Elution (1-1,3ml/min) mit Puffer GF; Sammeln von ~15ml-Fractionen

Im Fall der Proteine EGF-T3, T3 und der T3-Mutanten brauchten die entsprechenden Eluate der Gelfiltration nur noch durch Ionenaustausch-Chromatographie konzentriert und entsalzt werden.

2.7.4 Anionenaustausch-Chromatographie mit FPLC-Matrices

Die Endreinigung sowie die Konzentration der oligomeren Proteine und von mCOMP erfolgte durch Ionenaustausch-Chromatographie der GF-Fractionen mit hochauflösender, feiner Matrix auf fertig konfektionierten Säulen: Resource Q und Source Q basieren auf Polystyren/Divinyl-benzene-Kugeln mit 15µm Durchmesser, die Mono Q HR5/5 Säule (10µm-Partikel) wird vom Hersteller nur vage spezifiziert ("based on a beaded hydrophilic resin with one of the narrowest particle size available"); die genannten Matrices tragen quaternäre Amine als Ladungsträger. Die Eluate der Ionenaustausch-Chromatographie wurden gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und rechromatographiert, um aus kontaminierten Fractionen noch Protein zu isolieren. Die FPLC Gradienten wurden geringfügig variiert, um optimale Ergebnisse für jedes Protein zu erzielen. Mit dem folgenden, repräsentativen Gradienten wurde rCOMP aufgereinigt:

- > konfettierte Säulen: Source 15 Q bzw. Mono Q
- > Equilibrierung der Säule mit 2-3 Säulenvolumen Puffer GF (s.o.)
- > Auftrag von 5-45ml (0,5 ml/min) der vereinigten Eluate der Gelfiltration oder Rechromatographie der mit Wasser verdünnten Eluate aus der vorangegangenen Ionenaustausch-Chromatographie
- > Waschen der Säule mit ~2ml Puffer GF bei 0,5ml/min bis die Basislinie stabil erschien
Dabei: Sammeln des Durchlaufs bei Probenauftrag und Waschschritt;
- > Gradientenelution mit Puffer GF und Puffer HI (2M NaCl, sonst wie Puffer GF) mit 0,5ml/min;

- 50-245mM NaCl in 5ml (0-10% Puffer HI, 0-5ml);
- 245-540mM NaCl in 20ml (10-25% Puffer HI, 5-25ml);
- 540-2000mM NaCl in 5ml (25-100% Puffer HI, 25-30ml); Sammeln des Eluats in 1ml-Fractionen
- > Regeneration der Säulenmatrix mit 10ml Puffer HI, dann 10ml Puffer GF

2.8 UV-Spektroskopie

Die Absorption von UV-Licht durch Proteine wird durch die Peptidbindungen und aromatischen Seitenketten, in geringem Umfang auch durch oxidierte Cysteine (Cystine) hervorgerufen. Während Peptidbindungen unterhalb 230nm starke Absorption zeigen, besitzt im Bereich um 280nm Trp mit $\epsilon_{280} = 5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ den höchsten molaren Extinktionskoeffizienten, gefolgt von Tyrosin mit $\epsilon_{276} = 1450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\epsilon_{280} = 1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und Cystin mit $\epsilon_{276} = 145 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\epsilon_{280} = 120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); Phe ist mit $\epsilon_{257} = 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ an der Absorption bei 280nm praktisch nicht beteiligt; die genannten Werte wurden von Edelhoch (Edelhoch, 1967; zitiert nach: Gill und von Hippel, 1989) in 6M Gu-HCl, 20mM Phosphat, pH 6,5, und von Cantor in Wasser bei neutralem pH bestimmt (Cantor, 1980; zitiert nach: Schmid, 1989). Bei Abnahme der Polarität des Lösungsmittels bzw. im hydrophoben Proteininneren zeigen die Aromaten eine Rot-Verschiebung des Absorptionsmaximums; die Intensität und Breite dieses Maximums ändert sich hingegen selten. Wechselwirkungen von Trp und Tyr mit Pufferbestandteilen oder mit anderen Seitenketten können diese Effekte allerdings überlagern (Schmid, 1989).

Da sich die Absorption eines Proteins additiv aus der Summe der Absorptionen der beteiligten Aminosäuren zusammensetzt, läßt sich umgekehrt aus der Primärsequenz der molare Extinktionskoeffizient errechnen. Obwohl dieser Wert eigentlich nur für Aminosäuren in wässriger Umgebung gilt - was auf das Innere globulärer Proteine sicher nicht zutrifft - wurde gezeigt, daß der berechnete molare Extinktionskoeffizient in der Regel gut mit den in physiologischen Puffern gemessenen Werten übereinstimmt (Gill und von Hippel, 1989; Pace *et al.*, 1995).

Zur Überprüfung, inwieweit die theoretischen Werte auch für COMP auf physiologische Bedingungen übertragbar sind, wurde die Absorption in 6M Gu-HCl mit derjenigen in 20mM Phosphat, pH 6,5, in TBS und in 5mM Tris-HCl, pH 7,4, verglichen. Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden *online* am Schweizerischen Institut für Bioinformatik mit dem Programm PROTPARAM *in silico* berechnet (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

Die UV-Spektroskopie wurde routinemässig vor Fluoreszenz- oder CD-Messungen durchgeführt, um die Konzentration der Proteinlösungen aus der Extinktion bei 280nm zu bestimmen.

Vergleich der UV-Spektren in denaturierenden und physiologischen Puffern

Zur Untersuchung von T3 wurde eine 1,1x-Guanidinlösung aus kristallinem Gu-HCL ('purum', FLUKA) eingesetzt (6,67M Gu-HCl, 20mM Phosphatpuffer; pH 6,5); rCOMP und mCOMP wurden mit 8M Gu-HCL 'Microselect' (Fluka) ad 6M Gu-HCl verdünnt. Die Spektren wurden im Bereich von 230-350nm bzw.

bei T3 im Bereich von 200-350nm aufgezeichnet; die übrigen Parameter entsprachen den unter "UV-Spektroskopie zur Proteinquantifizierung" beschriebenen.

UV-Spektroskopie zur Proteinquantifizierung

Die UV-Spektren der Proteinproben wurden in Quarzglasküvetten (Hellma) mit 1cm Schichtdicke in einem Spektrophotometer Lambda 40 (Perkin Elmer) bei RT aufgezeichnet. Die Spektren umfassten den Bereich von 230-350nm oder 250-350nm bei 0,2nm Datenintervall, 2nm Schlitzweite und 60nm/min Abtastgeschwindigkeit. Als Leerwert diente der Puffer, in dem das Protein gelöst vorlag. Bei zur Abszisse parallelem Verlauf des Spektrums im Bereich 320-350nm wurde die Extinktion bei 320nm zur Korrektur der Küvettenstellung von den Messwerten subtrahiert. Nahm die Absorption im Bereich 320-350nm mit abnehmender Wellenlänge zu, wurde dies als Vorliegen von Aggregaten in der Probe interpretiert und der Messwert wie unter "UV-Spektroskopie zur Untersuchung der Aggregation" beschrieben korrigiert.

UV-Spektroskopie zur Untersuchung der Aggregation

Liegen in einer Lösung Partikel vor, tritt Lichtstreuung auf (Rayleigh Streuung), deren Intensität $I_s \sim \lambda^{-4}$ folgt und die sich proportional zum Quadrat des Molekulargewichtes verhält; diese Beziehung gilt für Teilchen, deren Größe deutlich unter der verwendeten Wellenlänge liegt ($<1/20 \lambda$) oder wenn das Streulicht in der Verlängerung des eintretenden Lichtstrahls gemessen wird.

Aminosäuren zeigen keine Absorption oberhalb 310nm, weswegen im längerwelligen Bereich Trübung (Lichtstreuung, *scattering*) detektiert werden kann, um Phänomene wie Fibrillenwachstum und Proteinaggregation zu untersuchen. Bei der Proteinquantifizierung ist die Korrektur der gemessenen Extinktionen bei 280nm (E_{280}) um den durch Trübung hervorgerufenen Beitrag ($E_{SC\ 280}$) eine wichtige Anwendung; bei geringer Lichtstreuung (relativ zu E_{280}) ist die *lineare* Extrapolation der Trübungskurve aus dem Bereich von 320-350nm auf den Wert bei 280nm in guter Näherung ausreichend. Bei deutlicher Lichtstreuung muß der ihr zugrundeliegende Kurvenverlauf bei der Extrapolation berücksichtigt werden.

Die Abhängigkeit der Trübung von der Wellenlänge ($I_s \sim \lambda^{-4}$) und die allgemeine Geradengleichung $y = a \cdot x + b$ führen zur Beschreibung der Trübungskurve durch: $\log(I_s) = a \cdot \log(\lambda) + b$; die Steigung a lässt sich aus den Logarithmen von 2 Wellenlängen (hier: 320 und 350nm) und den Logarithmen der Absorption bei diesen Wellenlängen bestimmen; die trübungsbedingte Extinktion bei 280nm lässt sich dann extrapolieren:

$$\log(E_{SC\ 280}) = 2,49 \times \log(E_{320}) - 1,49 \times \log(E_{350})$$

mit: $E_{SC\ 280}$ = Beitrag der Trübung zur gemessenen Extinktion bei 280nm

E_{320} = gemessene Extinktion bei 320nm

E_{350} = gemessene Extinktion bei 350nm

die Trübungs-korrigierte Extinktion ($E_{COR\ 280}$) ergibt sich aus der gemessenen Extinktion bei 280nm (E_{280}):

$$E_{COR\ 280} = E_{280} - E_{SC\ 280}$$

Aufzeichnung der UV-Spektren bei Aggregationsanalysen

In der ersten Versuchsserie wurden die Proteine bei einer Konzentration von 130-150µg/ml bei RT in TBS, TBS mit 0,25mM Ca^{2+} und TBS mit 1,5mM Ca^{2+} inkubiert und nach 40 min die Spektren im Bereich 240-350nm aufgezeichnet; die Abtastgeschwindigkeit betrug 30nm/min bei 0,2nm Datenintervall und 2nm Schlitzweite.

In einem zweiten Experiment wurde der Einfluss von Zn^{2+} auf das Aggregationsverhalten untersucht. Die Proteine wurden zu einer Konzentration von 10-16µg/ml in TBS verdünnt und das Spektrum von 250-450nm aufgezeichnet. Zu jeder Proteinlösung wurde sequentiell zugegeben: 1M ZnCl_2 ad 0,5mM Zn^{2+} , dann 1M CaCl_2 ad 2mM Ca^{2+} / 0,5mM Zn^{2+} , schließlich Zinklösung ad 2mM Ca^{2+} / 2mM Zn^{2+} ; nach jeder Zugabe wurde nach 1, 5 und 15 min ein Spektrum im Bereich von 250-450nm mit 120nm/min Abtastgeschwindigkeit, 2nm Schlitzweite und 0,2nm Datenintervall aufgezeichnet.

2.9 Intrinsische Fluoreszenz von Proteinen

Werden Proteine zur Fluoreszenz angeregt (intrinsische Fluoreszenz), bestimmen die delokalisierten Elektronen der aromatischen Aminosäuren und ihre elektronische Umgebung, welche Wellenlängen absorbiert und emittiert werden. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 280nm dominiert Tryptophan aufgrund seines hohen molaren Extinktionskoeffizienten (vgl. 2.8) und seiner Quantenausbeute $\phi_{348} = 0,2$ das Emissionsspektrum von 300-400nm mit einem Maximum bei ~340nm; die Fluoreszenz von Tyrosin mit $\phi_{303} = 0,14$ ist erheblich schwächer und Phenylalanin mit $\phi_{282} = 0,04$ spielt praktisch keine Rolle (Werte in Wasser, nach: Schmid, 1989). Bei Anregungswellenlängen größer als 295nm fluoresziert nur Tryptophan; durch Aufzeichnung der Emissionsspektren nach Excitation bei 280 und 295nm und Bildung des Differenzspektrums läßt sich der Beitrag von Tyrosin zum Gesamtsignal bestimmen.

Das Emissionsspektrum ist von der Art der fluoreszierenden Gruppen und ihrer elektronischen Umgebung abhängig. Die Lage und Intensität des Emissionsmaximums ändert sich, wenn Konformationsänderungen die Exposition des Systems delocalisierter Elektronen zum Lösungsmittel verändern, ein gebundener Ligand direkt mit dem Fluorophor und seiner Umgebung interagiert, oder ein Energietransfer auf benachbarte Aminosäuren möglich wird. Im Fall von Tyrosin bleibt meist das Fluoreszenzmaximum bei 303nm bestehen und nur die Intensität ändert sich; demgegenüber verändern sich bei Tryptophan sowohl Stärke als auch Lage des Fluoreszenzmaximums. In hydrophober Umgebung - wie im Inneren eines gefalteten Proteins - emittiert Trp i.A. bei kürzeren Wellenlängen (Schmid, 1989).

Durch die Fluorimetrie sollten die Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die Bindung von Calcium und die damit einhergehenden Konformationsänderungen von COMP untersucht werden. Dazu wurde das Protein durch die sequentielle Zugabe von CaCl_2 -Lösung von der Ca^{2+} -freien in die Ca^{2+} -gesättigte Konformation überführt; nach jeder Zugabe wurde 5min zur Einstellung des Gleichgewichtes abgewartet und das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet. Mit der Zugabe von EDTA wurde überprüft, ob diese Konformationsänderung reversibel war.

Aufzeichnung der Fluoreszenz-Spektren

Die Proben wurden vor der Fluoreszenzmessung UV-spektroskopisch quantifiziert; bei T3 und den T3-Mutanten lag die Proteinkonzentration im Bereich von 2,5-4µM. Die Proteine wurden in einem Luminescence Spectrometer LS50 B (Perkin Elmer) bei 25°C in einer thermostatisierten Fluoreszenz-Quarzküvette mit 280nm angeregt und das Emissionsspektrum im Bereich von 300-450nm aufgezeichnet oder das Excitationsspektrum von 250-300nm anhand der Emission bei 350nm untersucht. Die Spaltbreite der Anregung lag bei 2,5nm, die der Emission bei 5nm, bei einer Abtastgeschwindigkeit von 60nm/min. Die Spektren wurden um die Lichtstreuung in Wasser (Raman-Bande) korrigiert, wenn die absolute Lage des Emissionsmaximums bestimmt werden sollte.

Berechnung der relativen Änderung des Fluoreszenz-Signals nach Calciumbindung

Die prozentuale Signaländerung für die Ca²⁺-freie Form im Vergleich zur Ca²⁺-gesättigten Form stellt ein Maß für die Änderung der Struktur in der Umgebung des Fluorophors dar; sie wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta F_{350} = (F_{\infty} - F_0) \times 100 / F_{\infty} \quad \text{dieser Wert ist dimensionslos [\%]}$$

Mit: F_{∞} Fluoreszenzsignal des Ca²⁺-gesättigten Proteins bei 350nm (Anregung 280nm)

F_0 Fluoreszenzsignal des Ca²⁺-freien Proteins bei 350nm (Anregung 280nm)

(das Fluoreszenzsignal wurde in dimensionslosen Einheiten gemessen)

2.10 Fluoreszenz-Spektroskopie bei Ca²⁺-Titration des Proteins

Die Ca²⁺-Bindung an Proteine läßt sich qualitativ und quantitativ mit der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d und dem Bindungstyp - kooperativ oder nicht kooperativ - beschreiben. Zur Berechnung des K_d -Wertes wurden die gemessenen Werte bei schrittweiser Änderung der Ligandenkonzentration aufgezeichnet und die resultierenden Wertepaare mit unterschiedlichen Bindungsmodellen analysiert.

Ausgehend von der Ca²⁺-freien Form des Proteins wurde Ca²⁺ unter Verwendung von CaCl₂-Stocklösungen direkt zur Messlösung gegeben. Die residuale Ca²⁺-Konzentration von TBS, das aus Standard-Reagenzien der 'p.a.-Qualität' angesetzt wurde, lag bei 25µM; mit Chemikalien der Qualität 'Merck suprapur' hergestelltes TBS (als TBS_{supra} bezeichnet) enthielt 5µM Ca²⁺. In Kenntnis der basalen Ca²⁺-Konzentration und des zugesetzten Ca²⁺ wurde die Gesamtkonzentration Ca_{tot} berechnet.

Zur Auswertung der Titrationskurven wurden Funktionen, denen verschiedene Bindungsmodelle zugrundeliegen, an die Messdaten angepaßt, und das Modell ermittelt, welches die Messdaten am besten und plausibel beschreibt.

Durchführung der Ca²⁺-Titration und Aufzeichnung der Fluoreszenzspektren

Ein exakt abgemessenes Volumen der Proteinlösung wurde in einer rührbaren Fluoreszenz-Mikroküvette gemessen. Die Ca²⁺-Gesamtkonzentration der Probe wurde schrittweise durch Zugabe weniger µl einer konzentrierten CaCl₂-Lösung erhöht, bis sich das Fluoreszenzsignal nicht mehr änderte (Sättigung).

Analysiert wurden die Werte der Emission bei 350nm nach Anregung bei 280nm (s.o.). Die durch Zugabe der Ca^{2+} -Lösung entstandene Volumenzunahme wurde rechnerisch korrigiert. Die Fluoreszenzsignale im Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -gesättigten Zustand wurden als minimale und maximale Signalintensität eingesetzt, um den Sättigungsgrad Y des Proteins in den einzelnen Schritten der Titration zu berechnen. Der Sättigungsgrad Y ist definiert als das Verhältnis der Konzentration an besetzten Bindungsstellen [PL] zur Gesamtkonzentration an Bindungsstellen [P_0]:

$$(2.10.1) \quad Y = [\text{PL}] / [\text{P}_0] \quad (\text{Als relativer Wert ist Y dimensionslos})$$

Der Sättigungsgrad bei Messpunkt i errechnet sich aus den gemessenen Fluoreszenzsignalen wie folgt:

$$(2.10.2) \quad Y = (F_i - F_0) / (F_\infty - F_0)$$

Mit: F_i Fluoreszenzsignal des Messpunktes i

F_0 Fluoreszenzsignal des calciumfreien Proteins

F_∞ Fluoreszenzsignal des calciumgesättigten Proteins

Die beim Messpunkt i herrschende Konzentration des freien Liganden [L] (hier: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$) entspricht im Gleichgewicht der Differenz aus Gesamtkonzentration des Liganden [L_0] (hier: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ als Summe aus residualem und zugegebenen Ca^{2+}) und proteingebundenem Ligand [PL] (hier: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{gebunden}}$ als Produkt der Anzahl von Ca^{2+} -Bindungsstellen, Proteinkonzentration und Sättigung Y beim Messpunkt):

$$(2.10.3) \quad [\text{L}_0] = [\text{L}] + [\text{PL}]$$

Auflösung der Gleichung (2.10.3) nach [PL] und Einsetzen in Gl. (2.10.1) ergibt die Konzentration des freien Liganden [L], in diesem speziellen Fall also $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$:

$$(2.10.4) \quad [\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = [\text{L}] = [\text{L}_0] - Y \times [\text{P}_0]$$

Die Anpassung der Ca^{2+} -Bindungsmodelle an die Messwerte wird unter Abschnitt 2.13 zusammen für die Fluoreszenz- und CD-Messungen erläutert. Kontrollversuche zeigten, daß die sich die gemessenen Fluoreszenzsignale durch Zugabe von EDTA am Anfang eines Experimentes nicht änderten; die residuale Ca^{2+} -Konzentration von 5µM bzw. 25µM zeigte also noch keinen messbaren Effekt auf die Konformation bzw. Ca^{2+} -Sättigung des Proteins.

2.11 Circular Dichroismus-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung eines links und eines rechts drehenden zirkular polarisierten Lichtstrahls (mit den elektrischen Vektoren E_L und E_R) beschrieben werden. In der Lösung einer optisch aktiven Substanz sind die Brechungsindices für diese beiden Lichtstrahlen - also die Winkelgeschwindigkeiten der beiden E-Vektoren - unterschiedlich; beim Durchdringen der Lösung entsteht eine Phasendifferenz zwischen E_L und E_R , die wie bei der optischen Rotation eine Drehung der Polarisations-ebene um den Winkel α hervorruft. Ein anderer Aspekt ist die unterschiedliche Absorption der beiden

Lichtstrahlen durch die optisch aktive Substanz: Es liegen verschiedene Extinktionskoeffizienten für links- und rechtsdrehend zirkular polarisiertes Licht vor (Circular Dichroismus). Daher unterscheiden sich die Vektoren E_L und E_R in ihren Winkelgeschwindigkeiten **und** in ihrer Länge, und die Vektoraddition liefert einen Vektor E , dessen Spitze eine Ellipse beschreibt.

Der Winkel zwischen der großen Achse der Ellipse des austretenden Lichtstrahls und der ursprünglichen Polarisationssebene ist der Drehwinkel α . Die Form der Ellipse zeigt an, wie stark sich die Extinktionskoeffizienten für links- und rechtsdrehend polarisiertes Licht (ϵ_L und ϵ_R) unterscheiden; das Maß für den Circular Dichroismus ist die Elliptizität Θ , die als Arctangens vom Verhältnis der großen zur kleinen Ellipsenachse definiert ist. Damit die Elliptizität bei einer gegebenen Wellenlänge (Θ_λ) proportional zur Differenz der Absorptionen (ΔA) bzw. der Extinktionskoeffizienten ($\Delta \epsilon$) für links- und rechtsdrehend polarisiertes Licht:

$$\Theta_\lambda \propto (\epsilon_L - \epsilon_R)$$

In der Realität unterscheiden sich ϵ_L und ϵ_R wenig und Θ ist sehr klein. Dann gilt (Wollmer, 1983):

$$\Theta_\lambda = 2,303 \times \Delta A / 4 \quad \text{in [rad]} \quad \text{bzw.:} \quad \Theta_\lambda = (360 \times \ln(10) \times \Delta A) / (2 \times \pi \times 4) \quad \text{in [deg]}$$

Meist wird die Elliptizität nicht in der Einheit 'deg' angegeben, sondern in die spezifische Elliptizität umgerechnet, die den durchschnittlichen Beitrag der einzelnen Aminosäure am Gesamtsignal ausdrückt.

Durch ihren Circular Dichroismus (CD) können optisch aktive Substanzen charakterisiert werden; ihre CD-Signale treten in denselben Bereichen des Spektrums auf, in denen auch ihre Absorptionsbanden der liegen, vorausgesetzt, die dafür verantwortlichen Chromophore oder ihre molekulare Umgebung sind asymmetrisch. In Proteinen sind die Peptidbindungen und die aromatischen Seitengruppen optisch aktiv; vor allem in den periodischen Strukturen wie α -Helices und β -Faltblättern liegen die Peptidbindungen hochgeordnet vor und zeigen charakteristische CD-Spektren.

Durch systematischen Vergleich einer Vielzahl von röntgenkristallographisch gelösten Strukturen und der zugehörigen CD-Spektren wurden Algorithmen entwickelt, um die einem CD-Spektrum zugrundeliegenden Sekundärstrukturen zu rekonstruieren. Damit kann aus der spezifischen Elliptizität der Gehalt an α -Helix, β -Faltblatt, Schleifen und ungeordneten Strukturen eines Proteins abgeschätzt werden. Darüberhinaus ermöglicht diese Methode, Übergänge zwischen gefalteten und ungefalteten Formen eines Proteins zu beobachten (Schmid, 1989; Sreerama und Woody, 1994). Die Qualität der Vorhersage von Sekundärstrukturen steht und fällt damit, ob die CD-Spektren und Strukturen ähnlicher Proteine existieren, wie groß der auswertbare Wellenlängenbereich ist, und wie zutreffend die Algorithmen die Sekundärstrukturen erkennen (Greenfield, 1996).

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie sollte die korrekte Faltung der rekombinanten Proteine überprüft und ihre calciumabhängige Konformationsänderung analysiert werden.

Aufzeichnung der CD-Spektren

Proben bekannter Proteinkonzentration (150-250 µg/ml) wurden in einem JASCO 715 CD-Spektrometer (JASCO) bei 25°C in einer thermostatisierten Quarzküvette (Hellma) mit 1mm Schichtdicke analysiert. Die CD-Spektren wurden im Bereich von 187-250nm (bei Proteinproben in 5mM Tris-HCl) oder 197-250nm (bei Proben in TBS oder in Anwesenheit hoher Ca^{2+} -Konzentrationen) mit einer Geschwindigkeit von 10 nm/min aufgezeichnet; das Datenintervall betrug 0,1nm, die Response-Zeit 4s. Es wurden jeweils 5-6 Spektren akkumuliert und gemittelt; anschließend wurden die Spektren mit der geräteeigenen Software um den zuvor aufgezeichnete Beitrag des Puffers korrigiert. Die Spektren wurden anschließend um den Wert der Volumenänderung nach Zugabe von Ca^{2+} - oder EDTA-Lösung korrigiert, die Messwerte in die spezifische Elliptizität umgerechnet und geglättet.

Durch sequentielle Zugabe einer CaCl_2 -Lösung wurde das Protein von der Ca^{2+} -freien in die Ca^{2+} -gesättigte Konformation überführt. Mit der Zugabe von EDTA wurde überprüft, ob diese Konformationsänderung reversibel war. Nach jedem Pipettierschritt wurde durch zehnmaliges Kippen der Küvette und 6 min Inkubation die gleichmäßige Vermischung und Einstellung des neuen Gleichgewichts vor der nächsten Messung sichergestellt.

Berechnung der spezifischen Elliptizität $[\Theta]$

Die spezifische Elliptizität $[\Theta]$ berechnete sich nach:

$$(2.11.1) \quad [\Theta] = \Theta \times M_{\text{aa}} / (c \times d) \quad \text{mit der Einheit } [\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}]$$

Mit: Θ gemessene Elliptizität [mdeg]
 M_{aa} mittleres Molekulargewicht einer Aminosäure (110 g/mol)
 c Proteinkonzentration [mg/ml]
 d Schichtdicke der Küvette [mm]

Berechnung der relativen Signaländerung nach Calciumbindung

Die prozentuale Signaländerung für die calciumfreie Form im Vergleich zur calciumgesättigten Form stellt ein Maß für die Konformationsänderung eines Proteins dar. Sie wurde errechnet, indem die spezifische Elliptizität bei 215 - in einigen Experimenten auch bei 222nm - aus den Spektren abgelesen wurde; die relative Änderung der spezifischen Elliptizität $\Delta[\Theta]_{215}$ bzw. $\Delta[\Theta]_{222}$ ergab sich für die Ca^{2+} -freie Form im Vergleich zur Ca^{2+} -gesättigten Form nach:

$$(2.11.2) \quad \Delta[\Theta]_{\lambda} = ([\Theta]_{\infty} - [\Theta]_0) \times 100 / [\Theta]_{\infty} \quad \text{dimensionslos, in } [\%]$$

Mit: $[\Theta]_{\infty}$ spezifische Elliptizität des Ca^{2+} -gesättigten Proteins bei Wellenlänge λ [$\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$]
 $[\Theta]_0$ spezifische Elliptizität des Ca^{2+} -freien Proteins bei Wellenlänge λ [$\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$]

Abschätzung der Sekundärstrukturen durch Analyse der CD-Spektren

Wie schon erwähnt, zeigen die verschiedenen Sekundärstruktur-Elemente charakteristische CD-Spektren, die sich zur Abschätzung der Anteile an α -Helices (α), β -Faltblättern (β), Schleifen (t) und ungeordneter Bereiche (o) am Gesamtspektrum des untersuchten Proteins heranziehen lassen.

Im kurzwelligen Bereich des CD-Spektrums stört vor allem die Absorption durch Pufferbestandteile wie Chloridionen, Tris, HEPES etc. (Schmid, 1989); in der Folge regelt das CD-Spektrometer automatisch die Verstärkungsspannung des Detektors nach; eine Spannung über 800 Volt ist das Indiz für eine mangelhafte Datenqualität. Aus diesem Grund wurde zur Sekundärstruktur-Analyse der Bereich auf 195-250nm der CD-Spektren beschränkt; dieser Informationsverlust hat bei CONTIN (Provencher und Glöckner, 1981) geringe Folgen, da es maximal bis auf 193nm herab analysieren kann, das 'neuronale Netz' K2D (Andrade *et al.*, 1993) nutzt nur den Bereich von 200-241nm. Einzig das Programm Selcon (Sreerama und Woody, 1993) vermag auch den kurzwelligen Bereich des CD-Spektrums zu berücksichtigen.

Die CD-Spektren von EGF-T3 wurden in TBS, pH 7,4, die von T3, T3-D361Y, T3-D469 Δ , rCOMP und dem pseudomonomeren ψ -mCOMP in 5mM Tris-HCl, pH 7,4 aufgezeichnet. Aufgrund der Ca^{2+} -induzierten Aggregation von rCOMP und ψ -mCOMP waren die Spektren ihres Ca^{2+} -gesättigten Zustands nicht auswertbar. Die Analyse der Spektren wurde durch die Programme mit folgenden Parametern durchgeführt:

Bezeichnung	Anpassungsmodus	verwendete CD- & Sekundärstruktur-Datensätze
Selcon / KS	4 Strukturelemente	17 Referenzspektren in CDDATA.17 (Johnson, 1990) mit SSDATA.KS = Strukturelemente dieser 17 Proteine (berechnet nach: Kabsch und Sander, 1983)
Selcon / 33	4 Strukturelemente	33 Referenzspektren in CDDATA.33 (Johnson, 1990) mit SSDATA.33 = Strukturelemente dieser 33 Proteine (berechnet nach: Johnson, 1990)
Contin / #2	4 Strukturelemente	20 Referenzspektren in dataset#2 (PG_4_20.grp) (nach: Provencher und Glöckner, 1981; Venyaminov <i>et al.</i> , 1993)
K2D	3 Strukturelemente	weights.dat, vorgegebene Matrix des neuronalen Netzes

2.12 CD-Spektroskopie bei Ca^{2+} -Titration des Proteins

Wie schon unter 2.10 beschrieben wurde, dienten die CD-Spektren der Ca^{2+} -Titration von COMP dazu, verschiedene Bindungsmodelle an die Messdaten anzupassen, um ein Modell zu finden, welches die Messdaten am besten und plausibel beschreiben kann.

Durchführung der Ca^{2+} -Titration und Aufzeichnung der CD-Spektren

Die Messung wurde mit 200 μl der photometrisch quantifizierten Proteinlösung in einer 1mm-Quarz-küvette durchgeführt. Analog zu der unter 2.10 beschriebenen Vorgehensweise wurde die Ca^{2+} -Gesamtkonzentration der Probe schrittweise erhöht. Die Spektren wurden wie beschrieben gegen das Pufferspektrum und die Volumenzunahme korrigiert und mit der Proteinkonzentration in die spezifische Elliptizität $[\Theta]$ umgerechnet. Die Elliptizität bei 215nm - in einigen Experimenten auch bei 222nm - wurde abgelesen und zur Berechnung der Sättigung Y und der freien Calciumkonzentration genutzt.

Berechnung der Signaländerung als Funktion der freien Calciumkonzentration

Die CD-Signale wurden analog zu den Messwerten aus der intrinsischen Fluoreszenz aufgearbeitet (vgl. 2.10): Mit den Signalen des Ca^{2+} -freien und -gesättigten Zustands wurde der Sättigungsgrad Y des Proteins zum jeweiligen Messpunkt bestimmt. Die Sättigung erlaubte die Berechnung des proteingebundenen Calciums $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{gebunden}}$. Von der Ca^{2+} -Gesamtkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ wurde $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{gebunden}}$ subtrahiert; die Differenz entsprach der freien Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ und wurde in der graphischen Darstellung gegen den Sättigungsgrad aufgetragen. Der Sättigungsgrad Y errechnet sich nach:

$$(2.12.1) \quad Y = [\text{PL}] / [\text{P}_0]$$

Der zum Messpunkt i gehörende Sättigungsgrad errechnet sich aus den gemessenen Elliptizitäten nach:

$$(2.12.2) \quad Y_i = ([\Theta]_i - [\Theta]_0) / ([\Theta]_{\infty} - [\Theta]_0)$$

Mit: $[\Theta]_{\infty}$ spezifische Elliptizität des Ca^{2+} -gesättigten Proteins

$[\Theta]_0$ spezifische Elliptizität des Ca^{2+} -freien Proteins

$[\Theta]_i$ spezifische Elliptizität bei Messpunkt i

Die gesamte und die freie Konzentration des Liganden wurde analog zum Vorgehen bei den Fluoreszenzmessungen berechnet (vgl. Gl. 2.10.3 bis 2.10.4). Die Anpassung der Messwerte an ein Ca^{2+} -Bindungsmodell ist im folgenden Abschnitt 2.13 beschrieben.

2.13 Anpassung verschiedener Bindungsmodelle an die Messwerte zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten und der Kooperativität

Zur Auswertung der Titrationskurven wurden verschiedene Bindungsmodelle an die Messdaten angepasst, um das Modell und die dazugehörigen Parametern zu ermitteln, mit dem sich die Messwerte am besten beschreiben lassen. Die Ergebnisse sind immer auf Plausibilität zu prüfen. Die Anpassungen wurden mit dem Programm GraFit 3.0 (Erithacus Software) durchgeführt.

Die einfache Bindung: Ein Ligand bindet an eine Bindungsstelle

Die Bindung des Liganden L an das Protein P lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben:



Mit: P = freie Ligandenbindungsstelle

L = freier Ligand

PL = Proteinbindungsstelle mit gebundenem Ligand

Dabei ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d definiert durch:

$$(2.13.2) \quad K_d = ([P] \times [L]) / [PL]$$

Der Sättigungsgrad Y ist das Verhältnis der Konzentration an besetzten Bindungsstellen $[PL]$ zur Gesamtkonzentration an Bindungsstellen. Für eine Protein mit einer einzigen Bindungsstelle ist die Gesamtkonzentration an Bindungsstellen gleich der Gesamtkonzentration des Proteins $[P_o]$:

$$(2.13.3) \quad Y = [PL] / [P_o] = [PL] / ([P] + [PL])$$

Auflösen der Gl. (2.13.2) nach $[PL]$ und Einsetzen in Gl. (2.13.3) liefert eine neue Beschreibung von Y :

$$(2.13.4) \quad Y = [L] / (K_d + [L])$$

Die freie Ligandenkonzentration $[L]$ nimmt bei 50% Sättigung ($Y = 0,5$) denselben Wert an, wie die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante: $K_d = [L]$, oder im Spezialfall der Calciumbindung: $K_d = [Ca^{2+}]_{\text{frei}}$.

Ist der Bindungstyp experimentell nicht genau analysierbar, wird oft aus der Bindungskurve bei halbmaximaler Sättigung die Liganden-Konzentration abgelesen und als 'apparenter K_d -Wert' bezeichnet.

Bindung eines Liganden an zwei voneinander unabhängige Bindungsstellen eines Proteins

Die Ligandenbindung an ein Protein mit einer Bindungsstelle lässt sich auf ein Modell mit zwei unabhängigen Bindungsstellen (#1, #2) und den zugehörigen spezifischen Sättigungsgraden Y_1 bzw. Y_2 der beiden Bindungsstellen übertragen.

Der Sättigungsgrad Y (bezogen auf beide Bindungsstellen) ist der arithmetische Mittelwert der beiden Sättigungsgrade Y_1 und Y_2 der einzelnen Bindungsstellen:

$$(2.13.5) \quad Y = (Y_1 + Y_2) / 2 = ([L] / 2(K_{d1} + [L])) + ([L] / 2(K_{d2} + [L]))$$

oder allgemein für i Bindungsstellen formuliert:

$$(2.13.6) \quad Y = (Y_1 + \dots + Y_i) / i = [L] / (i(K_{d1} + [L])) + \dots + [L] / (i(K_{di} + [L]))$$

Im speziellen Fall, daß alle Bindungsstellen die gleiche Affinität zum Liganden aufweisen, vereinfacht sich und Gl. (2.13.6) zu Gl. (2.13.4); die Anzahl der Bindungsstellen muss dann durch direkten Nachweis der Anzahl gebundener Liganden bestimmt werden (vgl. 2.17: Gleichgewichtsdialyse).

Bindung eines Liganden an voneinander abhängige Bindungsstellen bei positiver Kooperativität

Die positive Kooperativität zweier Bindungsstellen bedeutet, daß nach Bindung des Liganden an die erste Bindungsstelle die Affinität der zweiten steigt. Thermodynamisch ist dies gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Energie, die bei der Bindung des zweiten Liganden freigesetzt wird; die freien Enthalpien ΔG_i der beiden Bindungsstellen liegen gekoppelt vor als $\Delta \Delta G$.

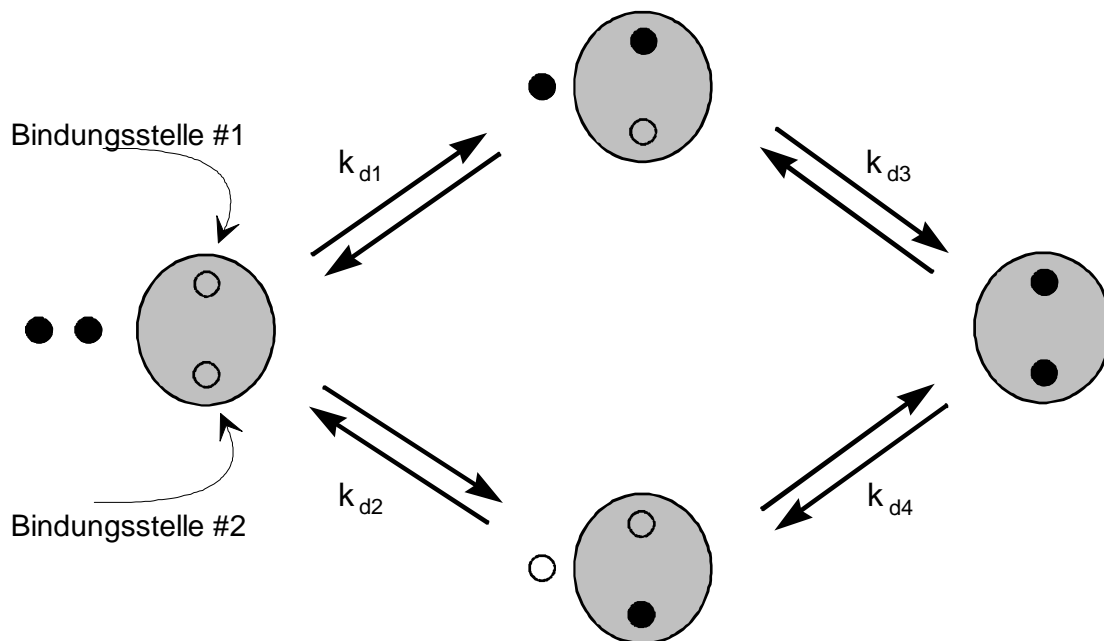
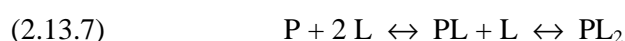


Abb. 7: Mikroskopisches Bindungsmodell. Der Ligand kann entweder erst mit k_{d1} an Bindungsstelle #1, dann mit k_{d3} an #2 binden, oder in umgekehrter Reihenfolge erst mit k_{d2} an #2, und dann mit k_{d4} an Bindungsstelle #1.

Die experimentelle Unterscheidung, an welcher Stelle der Ligand zuerst bindet, ist normalerweise nicht möglich. Daher ist es sinnvoll, statt der 'mikroskopischen' Betrachtungsweise (Abb. 7), bei der sowohl die eine, als auch die andere Bindungsstelle zuerst besetzt werden kann, eine 'makroskopisches' Modell anzuwenden (Abb. 8), das die beiden Bindungsstellen als ununterscheidbar behandelt:



Für die beiden makroskopischen Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_{d1} und K_{d2} gilt:

$$(2.13.8) \quad K_{d1} = [P] \times [L] / [PL] \quad \text{und:} \quad K_{d2} = ([PL] \times [L]) / [PL_2]$$

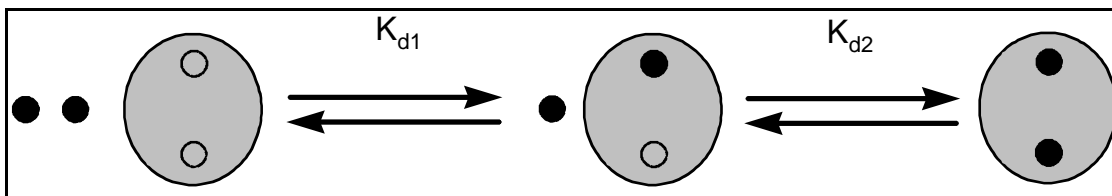


Abb. 8: Makroskopisches Bindungsmodell. Die beiden Bindungsstellen #1 und #2 und damit die Reihenfolge, in der sie vom Liganden besetzt werden, lassen sich nicht unterscheiden.

Die Gesamt-Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d und die Sättigung Y ergeben sich beim makroskopischen Modell zu:

$$(2.13.9) \quad K_d = K_{d1} \times K_{d2} = ([P] \times [L])^2 / [PL_2]$$

$$(2.13.10) \quad Y = ([PL] + 2 \times [PL_2]) / (2 \times ([P] + [PL] + [PL_2]))$$

Auflösung von Gl. (2.13.9) nach $[PL_2]$ und Einsetzen in Gl. (2.13.10) ergibt die Adair-Klotz-Gleichung:

$$(2.13.11) \quad Y = \frac{1}{2} (K_{d2} \times [L] + 2 \times [L]^2) / (K_{d2} \times [L] + [L]^2 + K_{d1} \times K_{d2})$$

Die mathematische Betrachtung bzw. die Auswertung experimenteller Daten mit dem makroskopischen Modell führt bei zunehmender Anzahl von Bindungsstellen zu solcher Komplexität, daß man bei mehr als 4 interagierenden (kooperativen) Ligandenbindungsstellen zur Beschreibung kooperativer Bindungen bzw. zur Anpassung der Bindungsparameter an die Meßwerte auf die Hill-Gleichung zurückgreift. Es handelt sich hierbei um ein empirisches Anpassungsverfahren und nicht um ein Bindungsmodell, denn das hypothetische Gleichgewicht $P + n \times L \leftrightarrow PL_n$ geht von einer physikalisch unmöglichen unendlichen Kooperativität der n Ligandenbindungsstellen aus: Entweder alle Bindungsstellen oder gar keine sind vom Liganden besetzt. Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d und der Sättigungsgrad Y dieser hypothetischen Bindung errechnen sich nach Hill wie folgt:

$$(2.13.12) \quad K_d^n = [P] \times [L]^n / [PL_n]$$

$$(2.13.13) \quad Y = n \times [PL_n] / n \times ([P] + [PL_n])$$

aus Gl. (2.13.12) und Gl. (2.13.13) ergibt sich die Sättigung Y mit:

$$(2.13.14) \quad Y = (n \times [P] \times [L]^n / K_d^n) / (n \times [P] \times (1 + [L]^n / K_d^n))$$

nach Umformung folgt für die Hill-Gleichung:

$$(2.13.15) \quad Y = [L]^n / (K_d^n + [L]^n) \quad \text{bzw.:} \quad Y / (1-Y) = [L] / K_d^n$$

Mit anderen Worten: Das Verhältnis von PL zu freiem P (der Sättigungsgrad) entspricht der n -ten Potenz des Verhältnisses von L zu K_d . Der Koeffizient wird als Hill-Koeffizient (n_H) bezeichnet und ist das Maß für die Kooperativität der Bindung. Eine reale Bindung kann nicht unendlich kooperativ sein; vielmehr ist der Hill-Koeffizient bei positiver Kooperativität größer als 1 und sein numerischer Wert kann maximal der Anzahl der beteiligten Ligandenbindungsstellen entsprechen: $1 < n_H \leq n$.

Biphasische, positiv kooperative Liganden-Bindung nach Hill

Bei der Auswertung der CD- und Fluoreszenzdaten wurden in einigen Fällen Modelle nach dem Hill-Ansatz eingesetzt, die eine biphasische Liganden-Bindung berücksichtigen. In diesem Fall wurde angenommen, daß zwei unabhängige Klassen mit ihren verschiedenen affinen, kooperativen Bindungsstellen zur gemessenen Signaländerung beitragen; die resultierende Bindungskurve war somit das Resultat der Überlagerung von zwei Bindungskurven. Der jeweilige Anteil der hoch- und niederaffinen Klassen zur Gesamt-Signaländerung Y war Teil der anzupassenden Parameter:

$$(2.13.16) \quad Y = (a \times L^{n_{H1}} / (K_{d1}^{n_{H1}} + L^{n_{H1}})) + ((1-a) \times L^{n_{H2}} / (K_{d2}^{n_{H2}} + L^{n_{H2}}))$$

mit:

a = Anteil der Klasse von hochaffinen kooperativen Bindungsstellen (mit K_{d1} , n_{H1}) am Gesamt-Signal

K_{d1} , n_{H1} = Gleichgewichts-Dissoziationskonstante und Hill-Koeffizient der hochaffinen Bindung

(1-a) = Anteil der Klasse von niederaffinen Bindungsstellen am Gesamt-Signal

K_{d2} , n_{H2} = Gleichgewichts-Dissoziationskonstante und Hill-Koeffizient der niederaffinen Bindung

2.14 Analyse der Kollagenbindung im ELISA-artigen Festphasen-System

Die Untersuchung der Interaktion von COMP mit Kollagen wurde in ELISA-artigen Festphasenbindungs-Experimenten durchgeführt. Hierzu wurden die Plastikoberflächen der Mulden von Mikrotiterplatten für 16h bei RT mit Kollagen in 1% Essigsäure (2µg/ml oder wie angegeben) inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3x mit TBS-T (TBS mit 0,05% Tween-20) gewaschen und restliche freie Bindungsstellen der Plastikoberfläche für 2h bei RT mit Block-Lösung (1% BSA 'modified Cohn Fraction V', Serva, in TBS) blockiert. Die Mulden wurden 5x mit TBS-T gewaschen, 1h bei RT mit dem jeweiligen Liganden in TBS inkubiert, erneut 5x gewaschen und mit dem α -COMP pAb (Di Cesare *et al.*, 1994a) (anti-Rinder-COMP-Serum aus Kaninchen, 1:1600 oder wie angegeben verdünnt in Block-Lösung). Nach erneutem Waschen (5x) wurde der Zweitantikörper (1:2000 oder wie angegeben in Block-Lösung verdünnter HRP-konjugierter anti-Kaninchen IgG, DAKO) zugegeben und nach 1h bei RT wieder 5x gewaschen. Gebundenes COMP wurde in einer Farbreaktion mit 100µl TMB-Detektionsmix nachgewiesen (100mM Natriumacetat/Zitronensäure-Puffer, pH6; 0,0026% H_2O_2 ; 62,5µg/ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) und mit 100µl 20% H_2SO_4 gestoppt. Die OD wurde bei 450nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer Multiscan MS (Labsystem) gemessen und ausgewertet.

Die Kollagene wurden als konzentrierte Stocklösung in 0,5M Essigsäure angesetzt und zentrifugiert (30 min, 21.000g, 4°C). Der Überstand wurde quantifiziert (s.u.), aliquotiert und bei 4°C aufbewahrt; Verdünnungen wurden unmittelbar vor dem Beschichten der Mikrotiterplatten in 1% Essigsäure angesetzt. Die angegebenen Ca^{2+} - oder Zn^{2+} -Konzentrationen wurden in allen Puffern und Waschlösungen ab dem Zeitpunkt der Blockierung mit BSA konstant beibehalten. Mit Ausnahme des Waschpuffers wurden die verwendeten TBS- und Block-Lösungen nach Einstellung des gewünschten Ca^{2+} - oder Zn^{2+} -Gehalts durch 0,22µm-Spritzenvorsatzfilter filtriert, um Partikel zu entfernen.

Mikrotiterplatten	96-Loch Platten, 'certified Maxisorb' (Nunc)
Kollagen I	pepsinextrahiert, aus Rattenschwanz (Sigma)
Kollagen II	pepsinextrahiert, aus Rindernasenscheidewand (Sigma)
Kollagen IX	rekombinant im Bacculovirussystem exprimiert (Pihlajamaa <i>et al.</i> , 1999)

Das rekombinante humane Kollagen IX wurde freundlicherweise von T. Pihlajamaa und L. Ala-Kokko, Oulu, Finnland zur Verfügung gestellt.

Weiterhin wurden Kollagen I mit der Bezeichnung 'Vitrogen' bzw. 'CELLON collagen' (pepsinextrahiert aus Rinderhaut; Cellon, Vertrieb durch Cell Systems), Kollagen I aus Kälberhaut und Kollagen II aus Rindertrachea (Sigma) verwendet. Die unter 'Ergebnisse' gezeigten Arbeiten wurden mit den drei erstgenannten Kollagenen durchgeführt; zwischen den Kollagenen I und II unterschiedlicher Herkunft wurden keine signifikanten Unterschiede der COMP-Bindung festgestellt.

Kollagen-Quantifizierung mit Bichinonsäure (BCA)

Die von Sigma bezogenen lyophilisierten Kollagene wurden als Stocklösungen in einer nominellen Konzentration - bezogen auf die Liefermenge - von 5 oder 10mg/ml in 1% Essigsäure resuspendiert. Entgegen der Spezifikation 'acid soluble' zeigte sich nach Zentrifugation (30 min, 21000g, 4°C) in einigen Proben ein Präzipitat. Die Überstände wurden mit BCA quantifiziert ('Bichinonic acid'-Nachweis, Pierce); zur Erstellung der Eichgerade diente dabei Kollagen I 'Vitrogen', das vom Hersteller durch Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl quantifiziert und als sterile, saure Lösung (pH~2) geliefert wird. In diesem Präparat konnte Aggregation weitgehend ausgeschlossen werden, weil es nie eingefroren war.

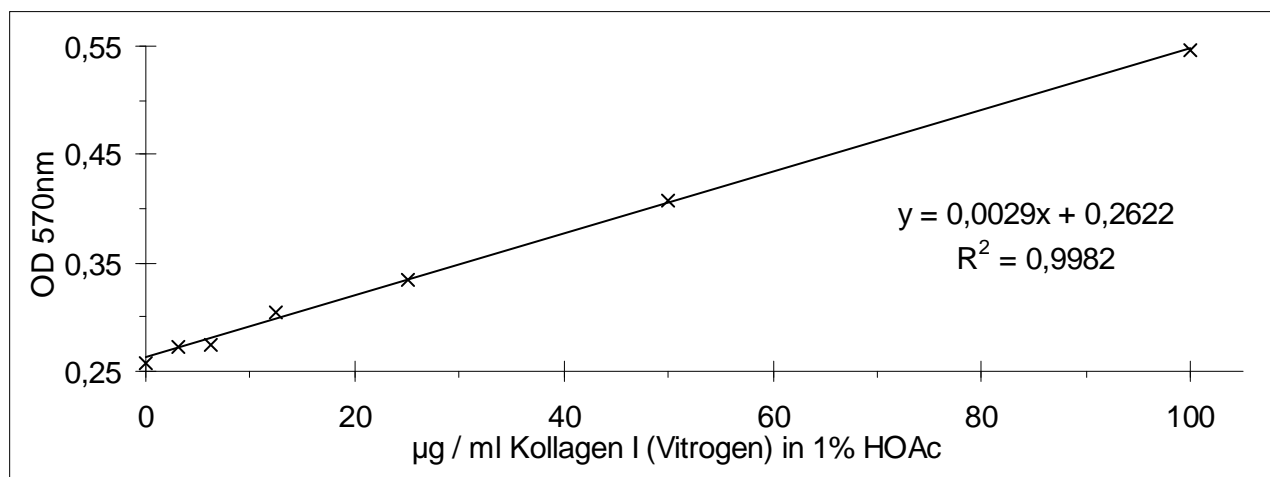


Abb. 9: Kollagenquantifizierung mit dem BCA-Nachweis. 300µl Detektionslösung und 15µl Kollagen I 'Vitrogen' (in 1% Essigsäure) wurden 2,5h bei 60°C inkubiert und bei 570nm photometrisch ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 Meßwerten, die errechnete Regressionsgerade und ihre Geradengleichung.

Da die BCA-Reaktion nur im alkalischen Bereich funktioniert, wurde der Detektionslösung (Pierce) zur Vermeidung eines pH-Abfalls durch die Essigsäure der Proben NaOH ad 5mM zugesetzt. Zur Protein-Quantifizierung wurden 300µl Detektionslösung und 15µl Kollagenlösung (50 und 100µg/ml in 1% Essigsäure) in Mikrotiterplatten bei 2,5h inkubiert (60°C) und bei 570nm gemessen.

In Abbildung 9 ist die Eichgerade dargestellt, und Tabelle 1 zeigt die Gegenüberstellung der nominalen und realen Konzentration nach Quantifizierung mit BCA. Die unvollständige Löslichkeit von Typ I Kollagen aus Kälberhaut und humaner Plazenta sowie Typ II Kollagen aus Rindertrachea zeigte sich bei der Quantifizierung in den starken Abweichungen vom erwarteten (nominellen) zum gemessenen Kollagengehalt (vgl. Tab. 1). Es blieb ungeklärt, welche unlöslichen Bestandteile die Abweichungen verursachten.

Tab. 1: Ergebnisse der Quantifizierung von lyophilisiertem, resolubilisiertem Kollagen.

Kollagen	OD 570nm	Konzentration (µg/ml)		Abweichung vom Nominalgehalt
		nach Regression	nominal	
Kollagen I, Rattenschwanz	0,416	53	50	+ 6%
Kollagen I, humane Plazenta	0,363	34,6	50	- 30%
Kollagen II, Rindernasenscheidewand	0,413	52	50	+ 4%
Kollagen II, Rindertrachea	0,458	67,4	50	+ 35%
Kollagen I, Kälberhaut	0,363	34,8	100	- 65%
Kollagen I, Rattenschwanz	0,571	106,4	100	+ 6%
Kollagen I, humane Plazenta	0,468	71,1	100	- 30%
Kollagen II, Rindernasenscheidewand	0,553	100,4	100	± 0
Kollagen II, Rindertrachea	0,585	111,2	100	+ 11%

Die Konzentration X (µg/ml) der in 1% Essigsäure verdünnten Kollagene wurde anhand der OD nach BCA-Nachweis mit der umgeformten Regressionformel (vgl. Abb. 9) mit $X = (OD_{570} - 0,2622) / 0,0029$ errechnet. Alle Werte sind das gerundete arithmetische Mittel von Dreifachbestimmungen.

2.15 Messungen der Oberflächen Plasmon Resonanz

Wird polarisiertes Licht auf eine dünne Goldschicht gelenkt, treten die elektromagnetischen Wellen bei einer definierten Kombination von Einstrahlwinkel und Wellenlänge in Wechselwirkung mit den frei beweglichen Elektronen der Goldoberfläche und versetzen sie in Schwingungen (Plasmaschwingung der *Plasmonen*). Das entstehende evaneszente Feld erstreckt sich auch in die Flüssigkeit, mit der die Lichtabgewandte Seite der Goldfolie in Kontakt steht. Unter dem Winkel, der zur Ausbildung des evaneszenten Feldes führt (Resonanzwinkel), wird eingestrahlt Licht absorbiert, bei allen übrigen Einstrahlwinkeln herrscht dagegen Totalreflexion. Die Änderung des Brechungsindex' der Interphase Goldoberfläche/Flüssigkeit ist direkt proportional zur Masse der Teilchen im evaneszenten Feld; daher äußert sich die Massezunahme bei Ligandenbindung in einer messbaren Veränderung des Resonanzwinkels (BIAcore Methods Manual, 1998; Gerthsen *et al.*, 1989).

Die Messungen der Oberflächen Plasmon Resonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) der COMP-Kollagen-Interaktion wurden von Krisztina Rosenberg (Lund, Schweden) auf einem BIAcore 2000 System durchgeführt. Die Carboxymethyl-Dextran-Oberflächen eines CM5 Sensorchips wurden nach Vorschrift von BIAcore mit EDAC und NHS aktiviert und 1700RU (*resonance units*) Kollagen I, 1200RU Kollagen II und 4700RU Kollagen IX immobilisiert; anschließend wurden die verbliebenen aktivierten Gruppen mit Ethanolamin blockiert. Der vierte Kanal des Sensorchips wurde gleichartig aktiviert, aber ohne Proteinkoppelung blockiert und diente als Leerwert, um Puffer-Matrix-Wechselwirkungen zu messen.

Es wurden 40 µl COMP bei 5 verschiedenen Konzentrationen (5-80nM) in HBS (25mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7,4) mit 0,5mM Zn^{2+} bei einer Flussrate von 80µl/min über die Oberflächen der vier Flusskanäle des Sensorchips gepumpt. Die Daten wurden mit der BIAevaluation Software (Version 3.0) ausgewertet, Messwerte unter 10RU wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Anpassung einer Bindungskurve an die Messwerte erfolgte mit einem Langmuir-Modell, das eine 1:1-Stöchiometrie der COMP-Kollagen-Interaktion berücksichtigte. Die Datensätze der Bindung eines COMP-Konstruktes bei unterschiedlichen Konzentrationen an ein Kollagen wurden unterschiedlich ausgewertet: Entweder wurde mit der System-eigenen Software die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante aus dem Verlauf aller Bindungskurven bei den verschiedenen untersuchten COMP-Konzentrationen gemeinsam berechnet ('global fit'), oder die Bindungsdaten wurden für jede COMP-Konzentration einzeln bestimmt und das arithmetische Mittel daraus gebildet ('local fit').

2.16 Rotary shadowing und Elektronenmikroskopie von COMP

Makromoleküle lassen sich nur in seltenen Fällen direkt elektronenmikroskopisch betrachten, meist sind Färbungen mit Schwermetallsalzen oder die *rotary shadowing* Technik (Engel und Furthmayr, 1987) zur Visualisierung nötig. Bei der letztgenannten Methode werden Proteine auf eine ebene Oberfläche (frisch gespaltenen Glimmer) gesprüht und getrocknet. Unter einem Winkel von 12-15° wird anschließend von der Seite ein Platin/Kohlenstoff-Partikelstrom auf die rotierende Probe gelenkt. Auf diese Weise entsteht eine 'schattenartige' Abbildung vom Oberflächenrelief der Proteine; der Platingehalt macht diese 'Schatten' im Elektronenmikroskop sichtbar.

Für die Analyse der Quartärstruktur (Abb. 20) wurde COMP in 0,15M Ammoniumformiat (pH 7,4) mit 0,5mM Zn^{2+} überführt, zur Untersuchung der Kollagenbindung (Abb. 39) wurde COMP in Gegenwart von 0,5mM Zn^{2+} , Ca^{2+} oder EDTA in 0,2M Ammoniumformiat (pH 7,4) mit Kollagen in equimolarem Verhältnis inkubiert (RT, 2h). Diese Lösung wurde mit 80% Glycerol im Verhältnis 1:1 gemischt, sofort auf Glimmer gesprüht und 16h im Vakuum getrocknet. Nach der anschließenden Platin/Kohlenstoff-Beschattung wurden die Proben auf Probenhalter (Kupfernetze) überführt und im Elektronenmikroskop photographiert. Der Sprühvorgang, die Beschattung und die Elektronenmikroskopie wurden freundlicherweise von Patric Nitsche, Köln, durchgeführt.

2.17 Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse wurde in Mikrodialysekammern (Membrapure, Heppenheim) bei Raumtemperatur durchgeführt. In der linken Dialysekammer wurden 150 µl der T3-Konstrukte (10µM) in TBS vorgelegt, in die rechte, durch eine Dialysemembran (Ausschlussgrenze 4 kDa) abgetrennte Kammer 150 µl TBS mit 2 mM CaCl_2 und 0,17 µCi $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Amersham Pharmacia Biotech). Nach Einstellung des Gleichgewichts (16 h) wurden aus beiden Kammern fünfmal je 10µl entnommen, mit je 1 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Flüssigszintillationszähler (Wallac1409, Turku) gezählt. Die Anzahl B an gebundenen Calciumionen pro Proteinmolekül wurde errechnet nach:

$$B = (\text{cpm}_{\text{linke Kammer}} - \text{cpm}_{\text{rechte Kammer}}) \times [\text{Ca}^{2+}] / ((\text{cpm}_{\text{linke Kammer}} + \text{cpm}_{\text{rechte Kammer}}) \times [\text{Protein}]).$$

$[\text{Ca}^{2+}]$ und $[\text{Protein}]$ bezeichnen hier die Stoffmenge (in mol) an Calcium bzw. Protein im System.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung der COMP cDNA Konstrukte

Mit dem rekombinant exprimierten COMP sollten Struktur und Funktion des Proteins sowie die Auswirkungen von Mutationen analysiert werden. Die Domänen-Grenzen von COMP sind nicht alle eindeutig definiert: Es existieren derzeit keine genauen Vorstellungen von der Sekundär- und Tertiärstruktur der Typ 3 Motive und der carboxyterminalen TC-Domäne. Im erstgenannten Bereich existieren 17, im terminalen Globulus zwei Cysteine, deren theoretische Kombination zu Disulfidbrücken eine große Zahl von Strukturen zulässt. Aus diesem Grund war nicht vorherzusagen, ob die Proteine mit den gewählten Domänengrenzen rekombinant exprimiert würden; insbesondere galt dies für das erste Typ 3 Motiv, das dem postulierten Sequenzkonsensus (Lawler und Hynes, 1986; Misenheimer und Mosher, 1995) nur unvollkommen entspricht. Daher sollten neben dem pentameren rCOMP und der als T3 bezeichneten isolierten Typ 3 Domäne auch die folgenden Proteine rekombinant exprimiert werden: Die monomere Untereinheit ohne Pentamerisierungsdomäne (mCOMP), die Typ 3 Domäne in Kombination mit der vierten EGF-Domäne (EGF-T3) und die Sequenz des zweiten bis achten Typ 3 Motivs (T3-7x) (Abb. 10).

Nachdem sich gezeigt hatte, daß diese Proteine alle in ausreichender Menge aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden konnten (s.u.), sollten die Mutationen D361Y, D469Δ und D475N *in vitro* in die cDNA eingeführt und im Kontext des Vollängereproteins sowie als isolierte Typ 3 Domäne exprimiert werden. Beim Menschen wurden die genannten Mutationen *in vivo* nachgewiesen: Die Punktmutation D361Y im vierten Typ 3 Motiv fand man bei Individuen mit Multipler Epiphysärer Dysplasie (MED) (Loughlin *et al.*, 1998), die Mutation D475N (Deere *et al.*, 1998) im siebten Typ 3 Motiv wurde bei Patienten mit Pseudoachondroplasie (PSACH) entdeckt; die Deletion D469Δ (Deere *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 1995; Ikegawa *et al.*, 1998; Loughlin *et al.*, 1998), ebenfalls im siebten Typ 3 Motiv, konnte bei etwa einem Drittel aller untersuchten Patienten mit PSACH identifiziert werden. Die Mutation D475N wurde exprimiert, aber bisher nicht weiter analysiert.

In dieser Arbeit werden die verschiedenen rekombinanten Konstrukte des Ratten-COMP ungeachtet ihrer wirklichen Länge einheitlich gezählt. Da sich die Positionen der publizierten PSACH- und MED-Mutationen auf humanes COMP beziehen, dient dessen Sequenz als Referenz für die Zählweise und Bezeichnung von Aminosäurepositionen. Das humane COMP umfasst zwei Aminosäuren mehr als Ratten-COMP: Das Signalpeptid ist einen Peptidrest länger und dem Verbindungsstück zwischen Oligomerisierungs- und erster EGF-Domäne lässt sich aufgrund von Homologievergleichen eine weitere 'zusätzliche' Aminosäure zuordnen. Wenn es nicht ausdrücklich anders erwähnt ist, werden in dieser Arbeit die Positionen im Ratten-COMP also entsprechend ihrer homologen Position in der Primärsequenz des humanen COMPs angegeben!

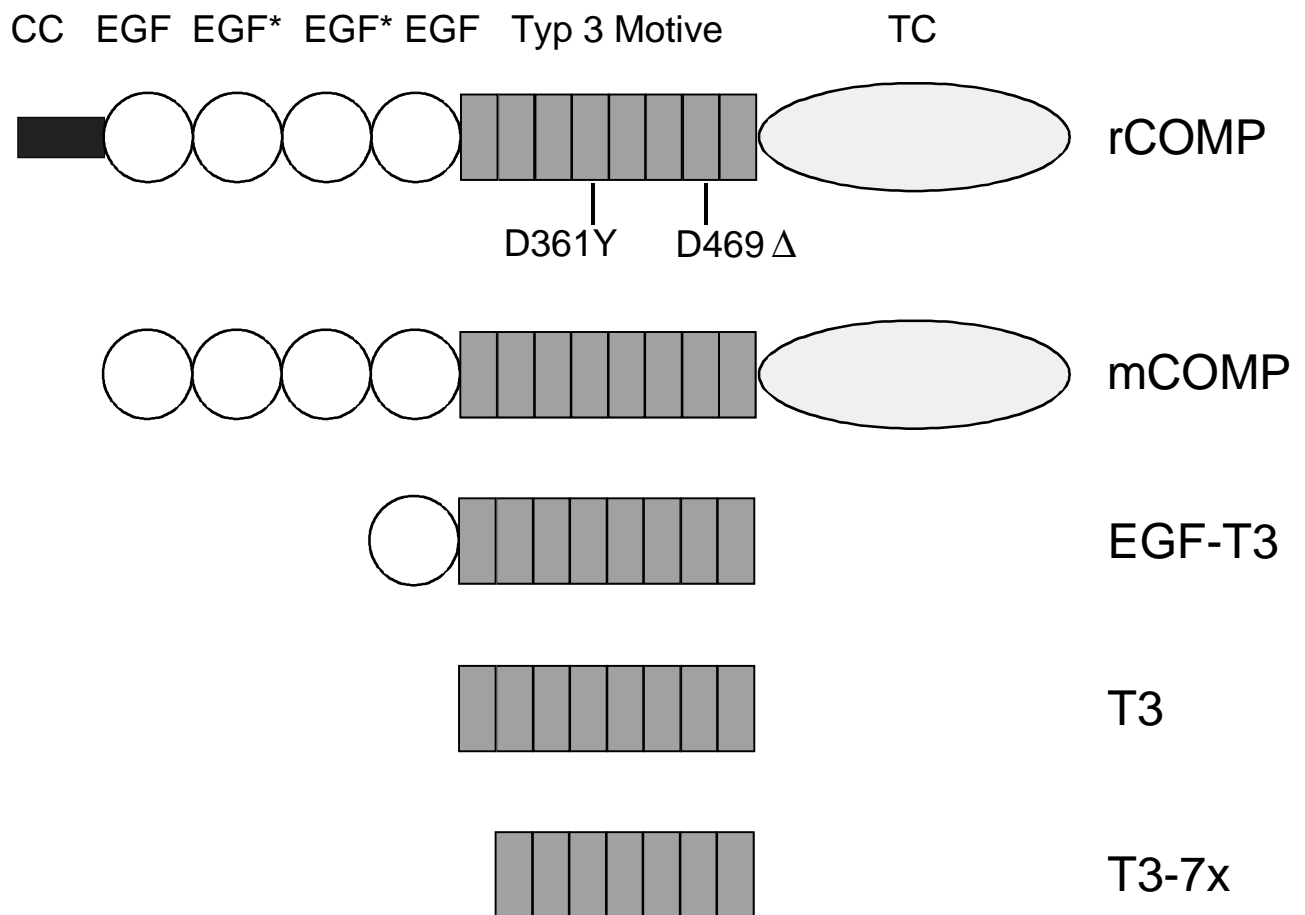


Abb. 10: Domänenstruktur von rekombinant exprimiertem COMP. Das Vollängkonstrukt rCOMP entspricht dem pentameren Wildtyp. Die *in vitro* eingeführten Mutationen D361Y (4. Typ 3 Motiv) und D469Δ (7. Typ 3 Motiv) sind eingezeichnet, die Mutation D475N ist 5 Peptidreste carboxyterminal der Deletion lokalisiert und nicht markiert. CC = Pentamerisierungs-Domäne ('coiled coil'); EGF = EGF-Domäne; EGF* = Ca^{2+} -bindende EGF-Domäne; TC = carboxyterminale, globuläre Domäne, die nur in den Thrombospondinen vorkommt.

3.1.1 Klonierung der cDNA von Wildtyp COMP

In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden mit entsprechenden Oligonukleotiden cDNA-Fragmente synthetisiert, deren 5'-Ende eine NheI- und deren 3'-Ende eine NotI- Erkennungssequenz aufwiesen; der 3'-Primer enthielt zusätzlich ein *amber* Stopcodon. Die PCR-Produkte wurden ungerichtet in das Plasmid pUC18 (HincII) kloniert, mit Restriktionsenzymen analysiert und sequenziert. Die gewünschte cDNA wurden im Leseraster hinter dem BM-40-Signalpeptid in den Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.*, 1997) eingefügt (NheI/NotI) und die flankierenden Bereiche nochmals sequenziert.

Mehrere Abweichungen (vgl. Anhang: 7.2) von der publizierten Sequenz (Oldberg *et al.*, 1992) wurden festgestellt (Zugriffsnummer von Ratten COMP: Protein P35444 und cDNA X72914). Die cDNA kodiert in der Pentamerisierungsdomäne die Aminosäuren (AS) Q53-Q54 in unreifem Ratten-COMP (entspricht Q38-Q39 in rCOMP) statt der veröffentlichten H53-R54; die Sequenzierung des originalen cDNA-Klons (von Å. Oldberg erhalten) bestätigte die vorgefundene Sequenz Q53-Q54, somit handelte es sich also nicht um eine neu erworbene Mutation, die aus der PCR resultierte. Unterstützt wurde dies durch die Arbeit von

Efimov, der zum gleichen Ergebnis kam (Efimov *et al.*, 1994), und durch die Tatsache, daß sich in der homologen Position in humanem COMP und in Thrombospondin 4 (TSP 4) von Mensch, Ratte und Krallenfrosch ebenfalls zwei Gln befinden (vgl. Anhang: 7.3). Zwei AS vor dem ersten Cys der ersten EGF-Domäne, befindet sich statt Ala (wie publiziert) ein Pro (P97 in unreifem Ratten-COMP; entspricht P72 in rCOMP), das sich auch in Maus-COMP und Krallenfrosch-TSP4 in dieser Position findet. Eine stille Mutation oder ein Publikationsfehler betraf ein Serin (S337 in unreifem Ratten-COMP; entspricht S322 in rCOMP), das von TCG und nicht von TCC kodiert wird. Im zweiten Typ 3 Motiv befindet sich nicht wie publiziert ein Gly, sondern ein Arg in Position 305 des unreifen Ratten-COMP (entspricht R290 in rCOMP); auch dieser Unterschied ließ sich nach Sequenzierung des Originalklons und durch Sequenzvergleiche (Mensch: TSP 1, TSP 2, TSP 3, TSP 4, COMP; Maus: TSP 1, TSP 2, TSP 3, COMP; Ratte: TSP 4; Krallenfrosch: TSP 1) eindeutig als Publikationsfehler identifizieren.

Die cDNA von rCOMP wies eine PCR-generierte Transition auf (T>C), die zum Austausch des zweiten Cys in der 4. EGF-Domäne zu Arg führte (C235 in unreifem Ratten-COMP bzw. C220 in rCOMP). Durch Umklonierung eines 510bp großen cDNA Fragments (ApaI/BstBI) der korrekten Sequenz wurde die unerwünschte Mutation in rCOMP beseitigt.

3.1.2 Einführung der Mutationen D361Y und D469Δ in die Wildtyp cDNA

Die Mutagenese der COMP cDNA erfolgte mit Oligonukleotiden, welche die mutierte Sequenz in Form einiger nichtkomplementärer Nukleotide enthielten; im selben Bereich wurden durch stille Mutationen neue Restriktionsenzymststellen zur Identifikation der rekombinanten Klone erzeugt: Die Mutagenese D361Y schuf eine neue Bst1107I (=SnaI)-Erkennungssequenz, bei D469Δ war es eine neue SphI-Schnittstelle, und im Fall von D475N eine zusätzliche KpnI-Sequenz.

In allen Fällen wurde die T3 cDNA gezielt mutiert, in pUC18 (HincII) oder pCR2.1 (T/A-Überhänge) kloniert, analysiert und sequenziert. Diese Klone umfassten nur die Sequenz der Typ 3 Domäne mit der jeweiligen eingeführten Mutation und erhielten analog zum Konstrukt T3 (Wildtyp) die Bezeichnung T3-D361Y, T3-D469Δ und T3-D475N. Ein 560bp großes Fragment (ClaI/BstBI) enthielt die Mutation und wurde gegen die entsprechende Sequenz der rCOMP cDNA ausgetauscht; damit war die Sequenz der Volllänge-cDNA in erwünschter Weise geändert. Die Verifizierung der Sequenzen und die Umklonierung in den Expressionsvektor pCEP-Pu erfolgte analog zu den Wildtyp Konstrukten.

3.2 Eukaryotische Expression der COMP-Konstrukte

Zur rekombinanten Expression wurden 293-EBNA Zellen (5×10^6) mit 3μg DNA durch Elektroporation transfiziert, ausplattiert und nach 48h mit Puromycin selektioniert; die Selektion war nach etwa 14 Tagen beendet. Konfluente Zellen wurden in serumfreiem Medium weiter kultiviert, der Überstand jeden zweiten Tag geerntet und mittels SDS-PAGE analysiert.

Es zeigte sich, daß alle Proteine exprimiert und ins Zellkulturmedium sezerniert wurden. Abb. 11 zeigt beispielhaft einige serumfreie Überstände nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Das Fragment T3-7x wurde schwächer exprimiert (Daten nicht gezeigt); nach SDS-PAGE ließen sich T3 und T3-7x im Vergleich zu rCOMP und mCOMP weniger intensiv mit Coomassie anfärben; allgemein wird dies häufig bei sehr sauren Proteinen beobachtet.

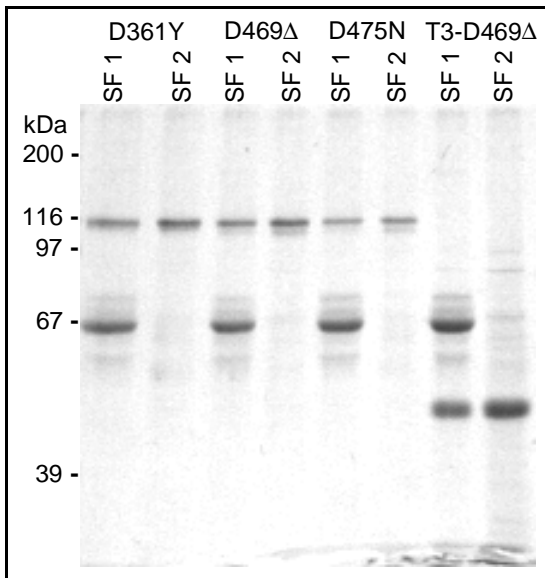


Abb. 11: Überstände COMP-sekretierender 293-EBNA Zellen. Zellkulturüberstand (je 35µl) von COMP-transfizierten 293-EBNA Zellen nach dem ersten (SF1) bzw. zweiten (SF2) Mediumwechsel mit serumfreiem Medium wurden auf einem reduzierenden 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Trotz Waschen des Zellrasens vor der ersten Zugabe von FCS-freiem Zellkultur-Medium verbleibt in SF1 noch eine deutliche Kontamination, erkennbar an der prominenten BSA-Bande (67 kDa). Coomassie-Färbung.

3.3 Aufreinigung der oligomeren COMP Proteine

Stellvertretend für die oligomeren COMP Proteine ist hier die Aufreinigung von rCOMP beschrieben; die mutierten oligomeren Proteine wurden gleichartig aufgereinigt. Im ersten Schritt diente ein grobkörniger Anionentauscher (Q Sepharose FastFlow) zur Konzentration der Proteine aus dem Überstand. Die Eluate der Ionenaustausch-Chromatographie wurden anschließend einer Gelfiltration (GF) auf Sepharose CL-6B unterworfen, um Proteinkontaminationen und Salze zu entfernen.

Wie in Abb. 12 gezeigt wird, eluierte rCOMP nicht bei einer definierten Salzkonzentration, sondern 'schmierte' über einen weiten Bereich. Die vereinigten Fraktionen wurden auf Sepharose CL-6B einer Gelfiltration unterworfen; eine SDS-PAGE der GF-Fraktionen zeigt Abb. 13. Unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigten sich drei Hauptbanden bei 500, 400 und 300 kDa, sowie Nebenbanden bei 200 und 80-100 kDa, die mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen bovines COMP (α -COMP pAb) reagierten (Daten nicht gezeigt). Die 500 kDa Bande repräsentierte das Pentamer und die Banden mit geringerem apparenten Molekulargewicht (MW_{app}) entsprachen Pseudo-Tetramer, -Trimer, -Dimer und -Monomer; die Entstehung dieser Pseudoformen (Ψ -mere) wird ausführlich unter Kapitel 3.6 erläutert. In Abb. 13 lässt sich zusätzlich eine unscharfe Bande erkennen (MW_{app} deutlich über 500 kDa), die in der Gelfiltration über einen weiten Bereich (Fraktionen 45-54) eluierte und deren Identität nicht geklärt wurde.

Die Endreinigung zur Entfernung der hochmolekularen Kontaminationen und Konzentration der Proteine erfolgte durch Ionenaustausch-Chromatographie auf hochauflösender Anionentauschermatrix (Resource Q und Mono Q); diese Eluate wurden gegebenenfalls rechromatographiert (Abb. 14) und durch Anionenaustausch-Chromatographie (HiTrap Q) konzentriert. Die gereinigten Proteine wurden mit Sephadex G25 (PD-10 Säule) in Tris-HCl, pH 7,4, umgepuffert.

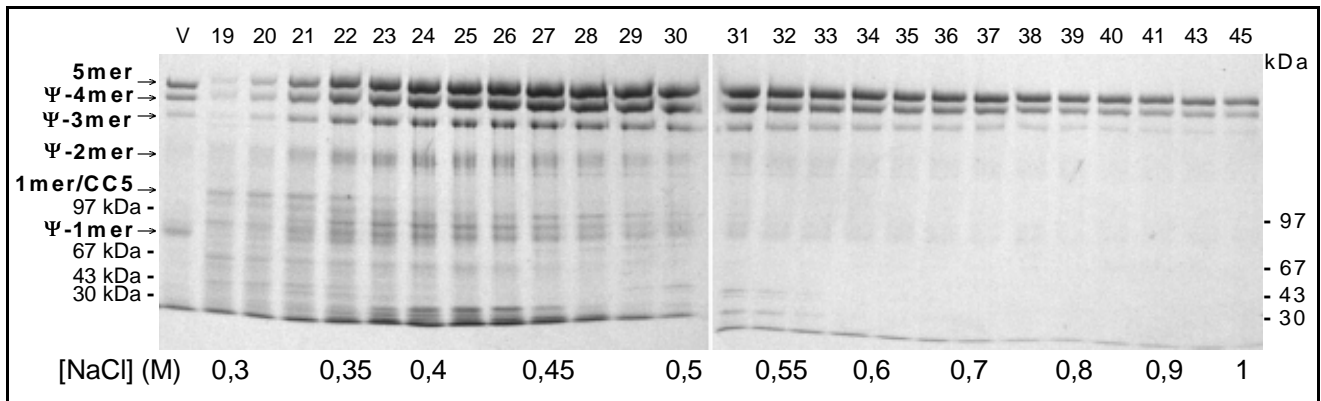


Abb. 12: Erste Anionenaustausch-Chromatographie von rCOMP-haltigem, serumfreiem Zellkulturüberstand auf Q-Sepharose FastFlow. Oben: Aliquots (15µl) der Eluate wurden nichtreduzierend durch 3-15% SDS-PAGE separiert und Coomassie-gefärbt. Die Position der Markerproteine und ihr Molekulargewicht ist angegeben; links sind die Banden der Pseudooligomere (Ψ-mere) markiert (siehe 3.6). Unten: Angabe der NaCl-Konzentration im Eluat.

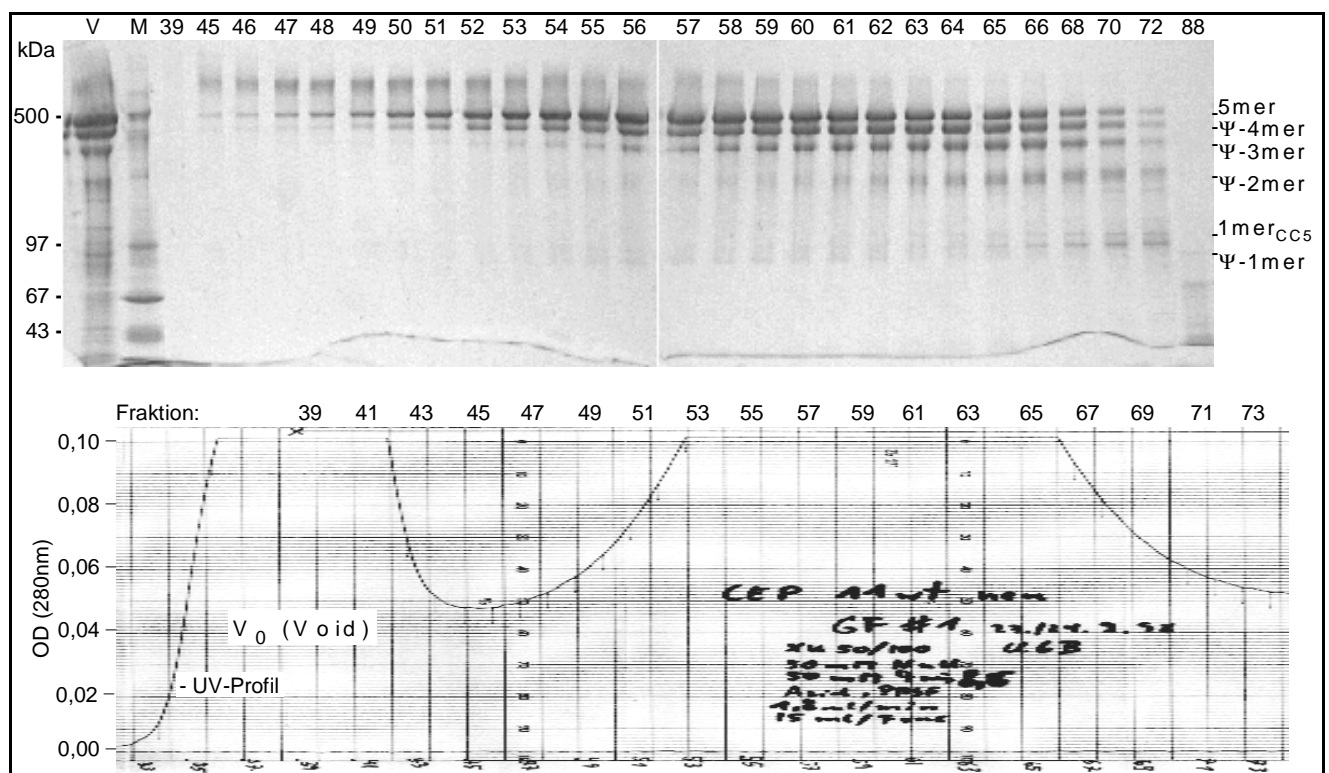


Abb. 13: Gelfiltration der Ionenaustauscher-Eluate von rCOMP mit Sepharose CL-6B. Oben: 35µl jeder 15ml-Fraktion wurde nichtreduzierend durch 3-15% SDS-PAGE aufgetrennt; Coomassie-Färbung. V = Vor Auftrag auf die Säule; M = Molekulargewichtsstandard; die Position der Pseudooligomere (Ψ-mere, vgl. 3.6) ist rechts eingezeichnet. Unten: Chromatogramm der Gelfiltration, das Ausschlussvolumen (*void volume*, V_0) ist markiert.

Die oligomeren Proteine konnten nur als Gemisch unterschiedlicher Oligomere isoliert werden (s.u.), die chromatographisch nicht restlos voneinander trennbar waren (Abb. 13, Abb. 14). Aus 1,5l Zellkulturüberstand wurde in 11 Ionenaustausch-Chromatographien und 3 Gelfiltrationsschritten etwa 1,1 mg Penta-/Tetramer-Gemisch isoliert. Die Ausbeute betrug bei oligomerem COMP 0,5-1 mg/l und bei den T3-Konstrukten 12-14mg/l (gereinigtes Protein/Volumen Zellkulturüberstand). Insgesamt wurden 2,5-3,5l Zellkulturüberstand von jedem Konstrukt aufgereinigt.

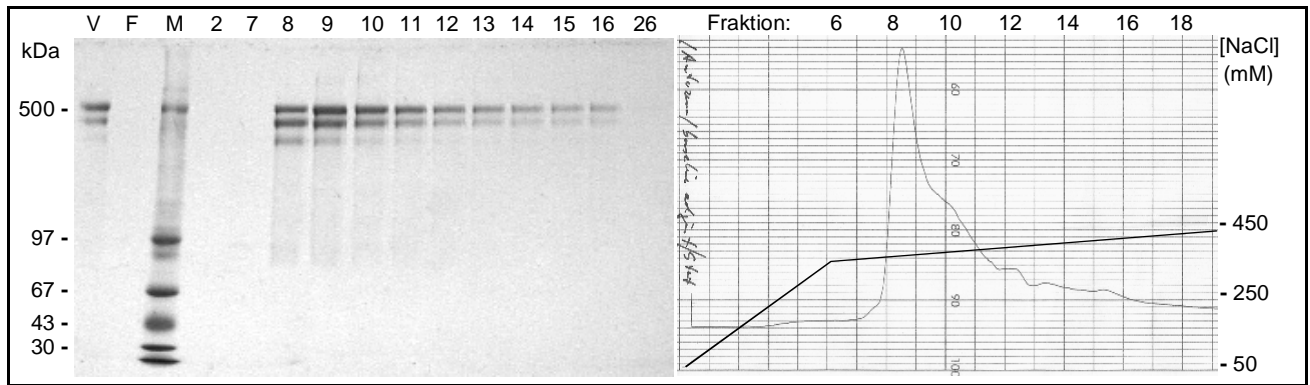


Abb. 14: Zweite Anionenaustauschchromatographie von rCOMP: Fraktionen nach Gelfiltration wurden auf Resource Q aufgetrennt. Links: 3-15% nichtreduzierendes SDS-PAGE, Coomassie-Färbung; rechts: Zugehöriges Chromatogramm. Die Fraktionen 8-9 wurden aufgrund des hohen Gehalts an Ψ -Trimeren unter gleichen Bedingungen rechromatographiert.

3.4 Aufreinigung der monomeren Fragmente EGF-T3, T3 und T3-7x

Die Aufreinigung der monomeren, kleinen Fragmente EGF-T3, T3 und T3-7x folgte prinzipiell dem gleichen Schema wie die Oligomer-Isolation: Ionenaustausch-Chromatographie zur Konzentration - Gelfiltration zur Abtrennung von Kontaminationen - Ionenaustausch-Chromatographie zur Konzentration und Endreinigung. Beispielhaft ist hier die Aufreinigung der Mutante T3-D361Y gezeigt.

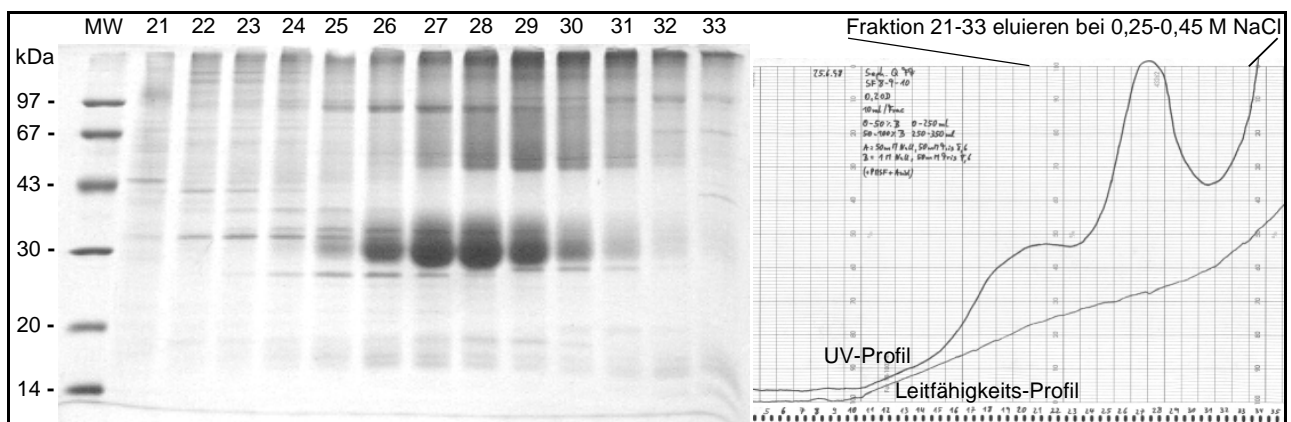


Abb. 15: Ionenaustauschchromatographie #1 von T3-D361Y mit Q-Sepharose FF. Links: nichtreduzierendes 15% SDS-PAGE, Coomassie-Färbung. MW = Molekulargewichtsstandard; rechts: zugehöriges Chromatogramm.

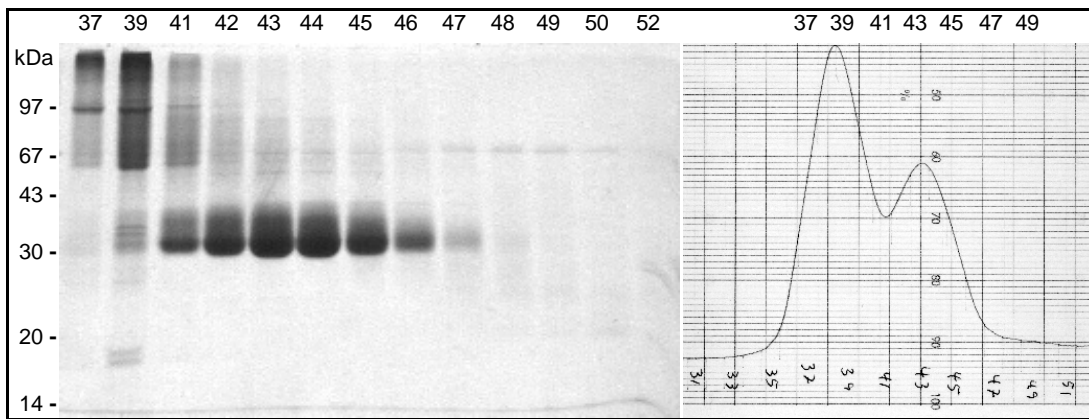


Abb. 16: Gelfiltration von T3-D361Y auf Sephadex G75 (F25-30 der ersten Ionenaustauschchromatographie). Die Fraktionsnummern sind über dem Photo der nichtreduzierenden 15% SDS-PAGE (links, nach Coomassie-Färbung) und dem zugehörigen Chromatogramm der Gelfiltration (rechts) angegeben. Die Fraktionen 37-39 umfassen das Ausschluss-Volumen.

Das Fragment T3-D361Y eluierte relativ scharf bei 0,3-0,35 M NaCl von der Q-Sepharose FF (Abb. 15) und ließ sich in der anschließenden Gelfiltration mit Sephadex G75 (Abb. 16) ohne Schwierigkeiten von höhermolekularen Bestandteilen abtrennen. Das Protein T3-7x wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie von 50ml Zellkulturüberstand auf einer HiTrap Q-Säule aufgetrennt und als semi-saubere Präparation isoliert; da T3-7x für die weitere Arbeit nicht von Bedeutung war, wird auf die Dokumentation dieser Aufreinigung verzichtet.

3.5 Apparentes Molekulargewicht der COMP-Proteine bei SDS-PAGE

Gemessen an den Markerproteinen (MW-Standards) entsprach das apparente Molekulargewicht (MW_{app}) der COMP-Konstrukte in der SDS-PAGE (Abb. 17) nur grob der *in silico* mit 'PROTPARAM' aus der Primärsequenz berechneten Masse; vermutlich binden stark saure Proteine weniger SDS und zeigen deshalb in der SDS-PAGE ein höheres MW_{app} , als bei Ultrazentrifugation oder Massenspektrometrie.

Die COMP-Konstrukte und MW-Marker verhielten sich in der SDS-PAGE bei verschiedenen Polyacrylamid- (PAA-) Konzentrationen uneinheitlich: Das reduzierte Ψ -Monomer D469 Δ (vgl. 3.6, Abb. 18) besaß in 7% PAA ein größeres, in 16% PAA ein niedrigeres MW_{app} als Phosphorylase b (97 kDa-Bande des MW-Markers). Die angegebenen apparenten Molekulargewichte (Tab. 2) sind daher nur eine Abschätzung, die sich aus den bevorzugt eingesetzten Elektrophoresebedingungen ergab: 10%, 3-10%, 4-12% & 3-15% PAA bei den Oligomeren; 10% & 12% PAA bei mCOMP; 12% & 15% PAA bei EGF-T3, T3 und T3-7x. Die Reduktion der Disulfidbrücken erhöhte das MW_{app} von mCOMP und der Ψ -Monomere (Tab. 2), was auf eine Kompaktierung der Protein-Struktur durch Disulfid-Brücken hinweist; angesichts der 43 Cysteine in mCOMP bzw. in den Pseudo-Monomeren überrascht dies auch nicht.

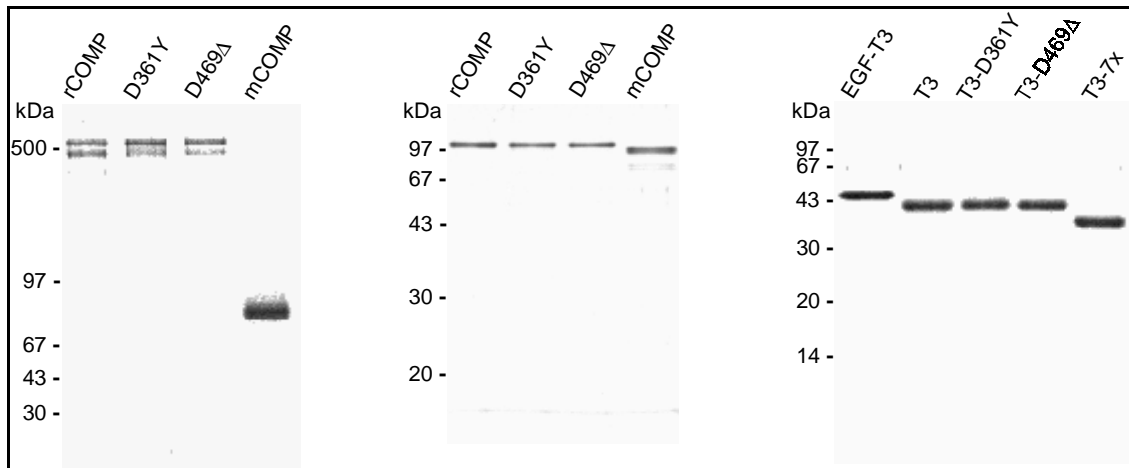


Abb. 17: SDS-PAGE der rekombinant exprimierten COMP Proteine nach Aufreinigung. Es wurden jeweils 1,5-2 µg Protein aufgetragen und das Gel anschließend Coomassie-gefärbt; links: 4-15% SDS-PAGE, nichtreduzierend; Mitte: 12% SDS-PAGE, reduzierend; rechts: 15% SDS-PAGE, reduzierend.

Tab. 2: Theoretische und apparente Molekulargewichte von rekombinantem COMP

Protein	Aminosäuren (Anzahl)	theoretisches MW der Primärsequenz (kDa)	apparentes MW in der SDS-PAGE -SH (kDa)	apparentes MW in der SDS-PAGE +SH (kDa)
rCOMP: Monomerkette	740	81,1	//	110
Pentamer	3700	405,3	500	//
Ψ-Monomere	680	74,5	80	105
Ψ-Monomere mit CC5 ⁽¹⁾	980 (740+240)	107,5 (81,1+26,4)	110	110 (+ 5kDa-Bande)
CC5 ⁽¹⁾	300	33,1	22	//
CC	60	6,6	//	5
mCOMP	671	73,5	80	105
EGF-T3	302	32,6	35	45
T3	261	28,3	30	40
T3-7x	235	25,3	25	35

Das apparente MW der COMP-Mutanten unterschied sich nicht, das theoretischen MW vernachlässigbar vom Wildtyp. Alle Werte beziehen sich auf das reife Protein ohne Signalpeptid; Glycosylierungen blieben unberücksichtigt.

⁽¹⁾ Bei proteolytischer Spaltung des pentameren rCOMP werden pentamere Oligomerisierungsdomänen (CC5) und Pseudo-Monomere ohne Oligomerisierungsdomäne freigesetzt (vgl. 3.6); in geringem Umfang bleibt vom ursprünglichen Pentamer nach Freisetzung von 4 Ψ-Monomeren eine intakte Polypeptidkette zurück, die über ihre Oligomerisierungsdomäne noch unverändert mit 4 weiteren Oligomerisierungsdomänen assoziiert ist (MW_{app}= 110 kDa).

3.6 Proteinsequenzierung der rekombinant exprimierten Proteine:

Die Oligomere werden proteolytisch abgebaut

Die Sekretion der COMP-Fragmente nach Transfektion spricht dafür, daß die Proteine die Kontrollmechanismen des endoplasmatischen Retikulums passieren konnten, also korrekt gefaltet und glycosyliert wurden. Die aminoterminal Sequenzierung der rekombinanten Wildtyp Proteine ergab folgende Sequenzen:

rCOMP	H_3N^+ - A P L A Q G Q I P L . . .
mCOMP	H_3N^+ - A P L A C A P G S C F . . .
EGF-T3	H_3N^+ - A P L A H F C P D G . . .
T3	H_3N^+ - A P L A R D T D L D G . . .
T3-7x	H_3N^+ - A P L A T V P N S G . . .

Die Expression als Fusionsprotein mit dem BM-40 Signalpeptid hatte zur Folge, daß nach Abspaltung des Signalpeptids die rekombinant exprimierten Proteine mit der Sequenz H_3N^+ -A P L A... beginnen; dies wurde durch die Sequenzierung der 10 aminoterminalen Peptidreste bestätigt.

Im Kulturüberstand von Zellen, die oligomeres COMP sekretierten, fand sich immer ein Gemisch verschiedener Banden, die mit dem α -COMP pAb reagierten (vgl. 3.3 und 3.5); die 500 kDa-Bande schien in Gegenwart von fötalem Kälberserum im Zellkulturmedium relativ zu den kleineren Banden intensiver zu sein. Dies läßt sich im Fall von D475N und D469 Δ anhand der Doppelbande bei 110 kDa im reduzierenden SDS-PAGE von Zellkulturüberständen (Abb. 11) nachvollziehen: Nach erstmaliger serumfreier Kultur (SF1) enthielt der Überstand noch deutlich FCS-Kontaminationen (erkennbar: die 67 kDa-Bande vom Serumalbumin), und die obere Bande des Duplets war relativ gesehen etwas stärker, als in den FCS-freien SF2-Aliquots.

Unter reduzierenden Bedingungen zeigten rCOMP und rCOMP Ψ -Monomere bzw. D469 Δ und D469 Δ Ψ -Monomere in der SDS-PAGE einen geringen, aber deutlichen Unterschied im apparenten Molekulargewicht (Abb. 18, links). Umgekehrt wurde bei 22 kDa eine Bande in der nichtreduzierenden SDS-PAGE von Ψ -Monomer-reichen Nebenfraktionen der COMP-Aufreinigung beobachtet (Abb. 18, rechts), deren MW_{app} ungefähr der erwarteten Größe der abgetrennten, pentameren Oligomerisierungsdomäne entsprach (Tab. 2). Bei Reduktion zerfiel dieses Fragment in ~5 kDa große Bruchstücke, was grob dem MW der monomeren Oligomerisierungsdomäne CC (60 AS) entspricht (Abb. 18, rechts; Tab. 2).

Die aminoterminal Ansequenzierung der rCOMP Ψ -Monomere ergab statt der erwarteten Sequenz H_3N^+ -APLAQGQIP... überraschend folgendes Ergebnis:

rCOMP Ψ -Monomere	H_3N^+ - A R T P G L S V . . .
------------------------	----------------------------------

Diese Sequenz beginnt drei AS hinter der Oligomerisierungsdomäne bzw. 13 AS vor der ersten EGF-Domäne, in einem vermutlich ungefalteten, flexiblen Verbindungsstück. Die intermolekularen Cystine, die die Superhelix der Oligomerisierungsdomäne maßgeblich stabilisieren, liegen fünf und acht Peptidreste vor dem N-Terminus der Ψ -Monomere.

Da die Oligomerisierung von COMP vermutlich wie bei Thrombospondin-1 cotranslational im ER stattfindet (Kuznetsov *et al.*, 1997), stellen die Ψ -Monomere bzw. Ψ -Oligomere das Ergebnis einer proteolytischen Aktivität dar, die zwischen Oligomerisierungsdomäne und der ersten EGF-Domäne das Peptidrückrat auftrennt. Aus dem pentameren, 'Blumenstrauß-förmigen' COMP (Mörgelin *et al.*, 1992) wird proteolytisch ein monomerer 'Arm' freigesetzt, der aus den EGF-Domänen, den Typ 3 Motiven und der TC Domäne besteht. Bis auf ihre zusätzlichen 13 Aminosäuren am N-Terminus stimmen die Ψ -Monomere mit mCOMP überein (wenn man vom klonierungsbedingten H_3N^+ -A-P-L-A bei mCOMP einmal absieht).

Damit erklärt sich auch das Auftreten der 400 kDa, 300 kDa und 200 kDa-Banden bei nichtreduzierender SDS-PAGE (vgl. Abb. 12-14): Die Ψ -Oligomere repräsentieren den Komplex aus pentamerer, Disulfid-stabilisierter Oligomerisierungsdomäne und vier, drei oder zwei 'Armen' dar (jeweils aus vier EGF-, der Typ 3 und TC-Domäne bestehend); die Ψ -Monomere bestehen aus einer intakten Untereinheit, die noch über eine pentamere Oligomerisierungsdomäne verfügt.

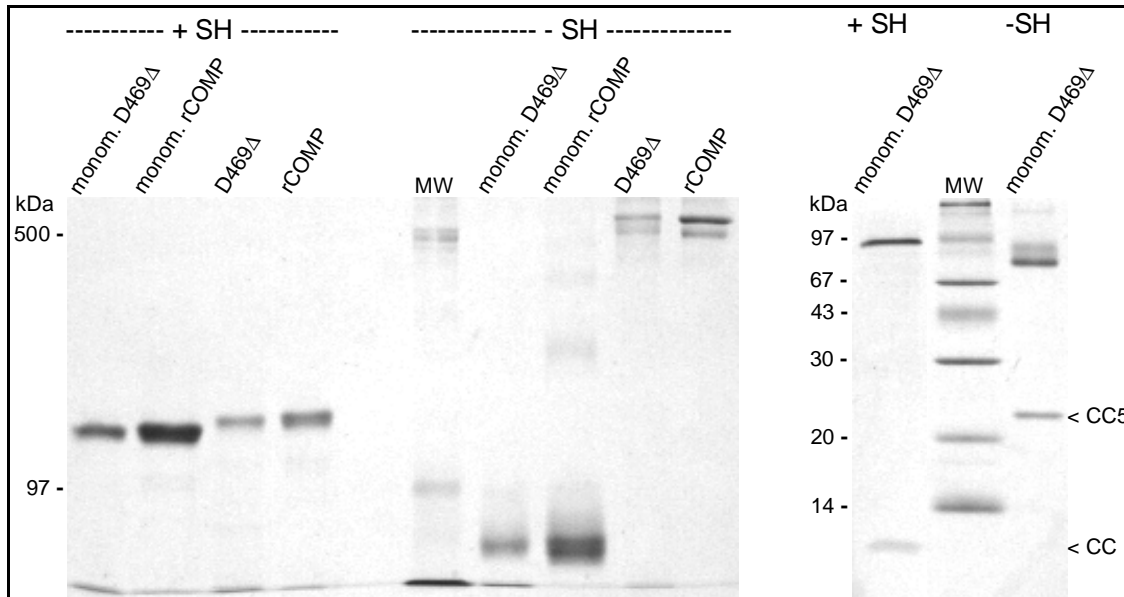


Abb. 18: SDS-PAGE der verschiedenen Oligomerisierungsformen von rCOMP und D469Δ. In der Zellkultur erfolgt proteolytischer Abbau von pentamerem COMP zu Pseudo-Oligomeren. Links: Reduziert (+SH) wandern die isolierten Pseudo-Monomere (Ψ -Monomere) 'monom. D469Δ' und 'monom. rCOMP' mit einem MW_{app} von 105 kDa und die Pentamere D469Δ und rCOMP mit 110 kDa. Mitte: nichtreduziert (-SH) beträgt das MW_{app} der Ψ -Monomere 85 kDa und das der Pentamere 500 kDa (Ψ -Tetramere in der Pentamerpräparation: 400 kDa). Rechts: Die Ψ -Monomere (monom. D469Δ) sind mit pentameren Oligomerisierungsdomänen (CC5, 22 kDa) kontaminiert, die bei Reduktion in monomere Oligomerisierungsdomänen (CC, 5 kDa) zerfallen. Coomassie-Färbung; links und Mitte: 7%ige SDS-PAGE, rechts: 16%ige SDS-PAGE.

3.7 Glycosylierung von rekombinantem COMP

Extrazelluläre Proteine werden fast ausnahmslos im ER und Golgi-Apparat glycosyliert. Bei humanem COMP wurde die Glycosylierung von N101 und N722, aber nicht von N124 nachgewiesen; auch O-Glycosylierung fehlte (Hedbom *et al.*, 1992; Zaia *et al.*, 1997). Auf den Konsensus der N-Glycosylierung (N-X-T/S) der nichtbenutzten N124-Glycosylierungsstelle folgt ein Prolin; für andere Proteine wurde gezeigt, daß ein Prolin hinter dem Konsensus die Glycosylierung verhindert (Gavel und von Heijne, 1990).

Es sollte überprüft werden, ob die rekombinanten Proteine ebenfalls Zuckerstrukturen tragen. Dazu wurden die Proteine nach SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert, die vorhandenen viscinalen Diole der Zucker mit Perjodsäure oxidiert und anschließend biotinyliert. Das Biotinderivat wurde in einer Chemolumineszenz-Reaktion nachgewiesen.

In Abb. 19 ist gezeigt, daß sich bei rekombinantem und aus bovinem Knorpel extrahiertem COMP eine Glycosylierung nachweisen lässt. In der SDS-PAGE wanderte tCOMP mit höherem MW_{app} als die rekombinanten Ratten-Proteine; da nur kurze Bereiche der Sequenz von bovinem COMP bekannt sind, ließ sich nicht klären, ob Unterschiede in der Glycosylierung oder in der Primärsequenz der Grund waren. Als Negativkontrolle dienten die Markerproteine und das Glykoprotein Laminin-1 stellte eine Positivkontrolle dar.

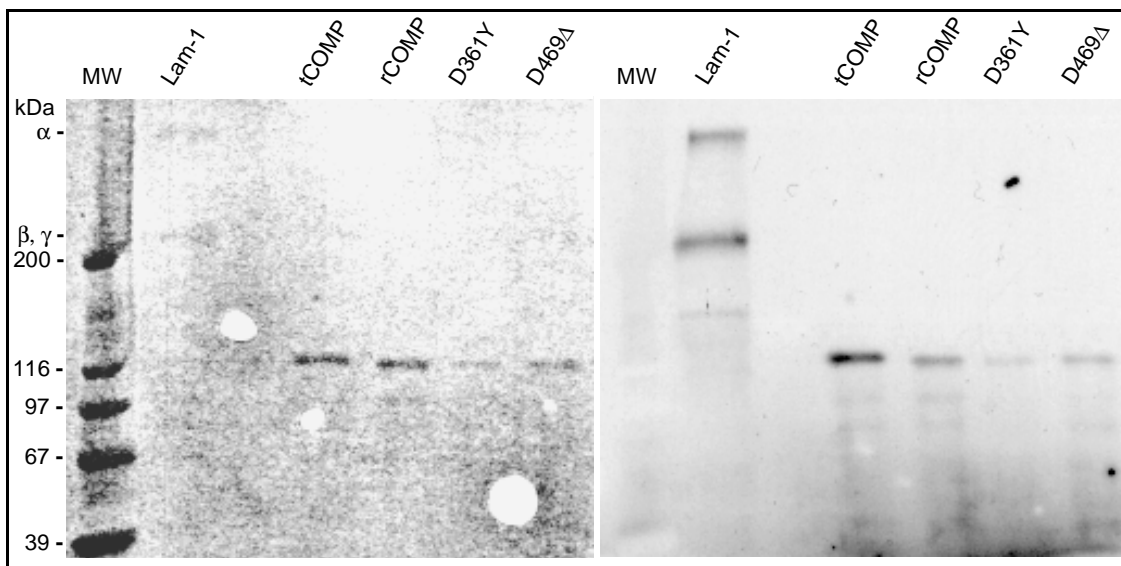


Abb. 19: Nachweis der Glycosylierung von rekombinantem COMP. Lam-1 (aus Gewebe isoliertes Laminin-1), tCOMP, rCOMP, D361Y und D469Δ wurden durch SDS-PAGE (10% PAA, reduzierend) aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Saccharide wurden oxidiert, biotinyliert und in einer Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen. Die α1- (400 kDa), β1- und γ1-Ketten (beide ≥200kDa) von Laminin-1 dienten als Positivkontrolle. Links: Ponceau S-gefärbte Nitrozellulosemembran; rechts: exponierter Röntgenfilm.

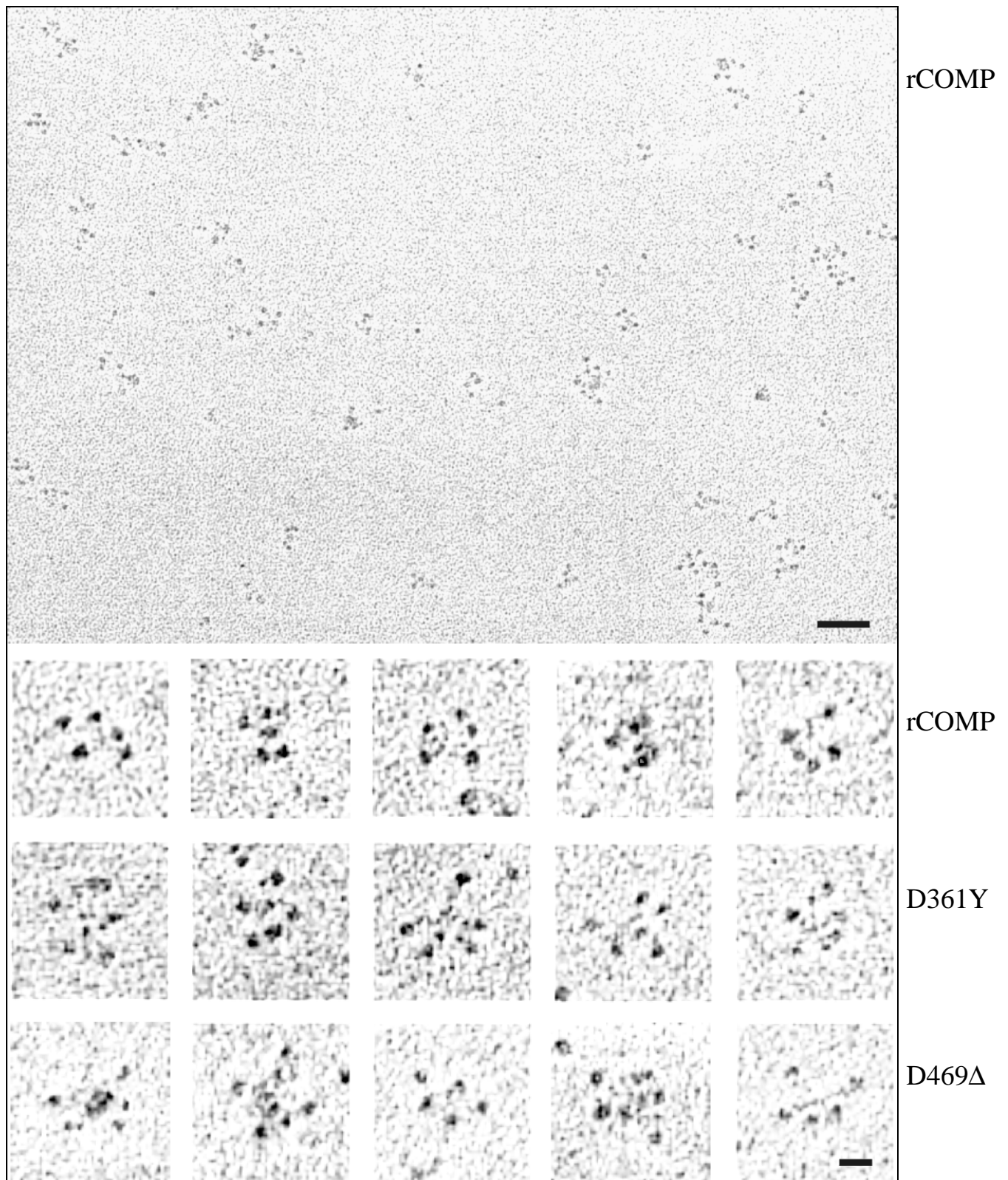


Abb. 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach *rotary shadowing* von rCOMP, D361Y und D469Δ. Die Proteine wurden in 0,15M Ammoniumformiat, pH 7,4, mit 0,5mM ZnCl₂ umgepuffert, dann 1:1 mit Glycerol (ad 40%) versetzt, sofort auf Glimmer gesprüht und mit Kohlenstoff/Platin beschichtet.

Oben, großes Photo: rCOMP; Überblick über einen repräsentativen Ausschnitt; der Balken entspricht 100nm

Unten: Ausschnittsvergrößerungen von rCOMP, obere Reihe; D361Y, Mitte; D469Δ, unten; (Balken: 25nm).

3.8 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des rekombinanten COMP

Die Quartärstruktur von rekombinantem COMP wurde elektronenmikroskopisch nach *rotary shadowing* (Engel und Furthmayr, 1987) untersucht. Die Aufnahmen (Abb. 20) zeigen pentamere Strukturen, die dem beschriebenen 'Blumenstrauß-artigen' Erscheinungsbild entsprechen (Mörgelin *et al.*, 1992): Fünf periphere, runde Strukturen repräsentieren die globulären TC-Domänen. Sie werden durch einen stabförmigen Bereich, der den vier EGF- und der Typ 3 Domäne entspricht, mit einer zentral gelegenen, zylindrisch bis rechteckig erscheinenden Struktur verbunden, welche die aminoterminal Oligomerisierungsdomäne repräsentiert. Die Aufnahmen von rCOMP, D361Y und D469Δ zeigten den gleichen strukturellen Aufbau.

3.9 UV-Spektroskopie zur Quantifizierung der Proteinlösungen

Der molare Extinktionskoeffizient bei 280nm (ϵ_{280}) eines denaturierten Proteins in 6M Guanidin-HCl, 20mM Phosphat, pH 6,5 lässt sich aus dem Gehalt an Tyrosin, Tryptophan und Cystin berechnen; oft sind die ϵ_{280} -Werte unter nicht-denaturierenden und denaturierenden Bedingungen annähernd gleich (Gill und von Hippel, 1989; Pace *et al.*, 1995). Die Extinktionen unter nicht-denaturierenden und denaturierenden Bedingungen wurden verglichen, um die Anwendbarkeit des *in silico* berechneten Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} zur Quantifizierung nichtdenaturierten Proteins zu prüfen. Die theoretischen Werte gelten für oxidierte Cysteine, die als 'halbe' Cystine in Disulfidbrücken vorliegen; bei 45 Cysteinen in den Vollänge- und 17 in den T3-Konstrukten ist dies bei Mono- oder Pentameren genaugenommen unzulässig. Da die Cystine zur Gesamtabsorption nur geringfügig beitragen, wurde dieser Fehler bei der Quantifizierung vernachlässigt.

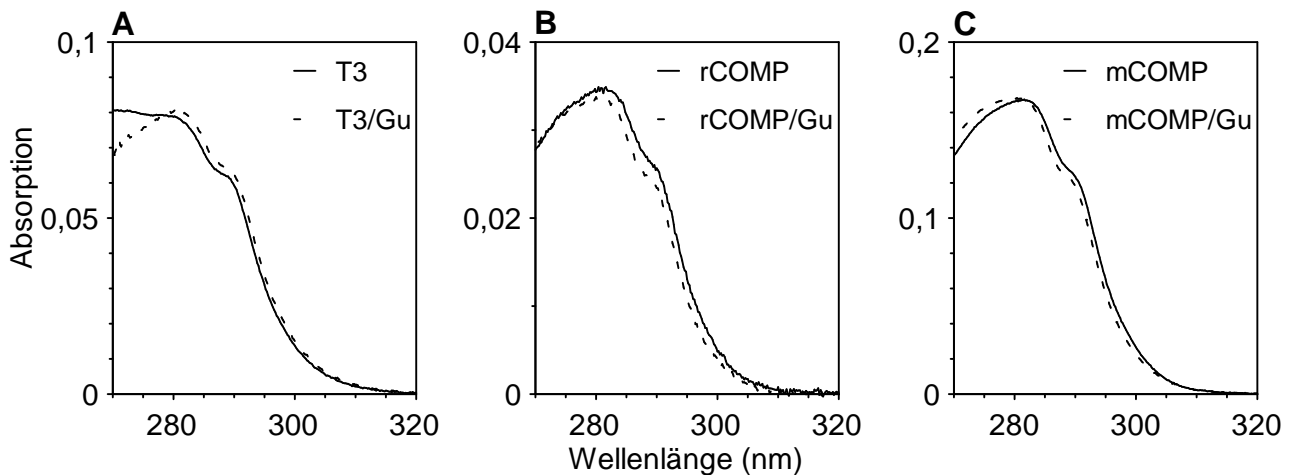


Abb. 21: UV-Spektren von COMP in nichtdenaturierenden Puffern und in 6M Guanidin-HCl (Gu-HCl). Die Spektren von T3 in 20mM Phosphat (A), rCOMP in TBS pH 7,4 (B) und mCOMP in 5mM Tris-HCl, pH 7,4, (C) (durchgezogene Linie) unterscheiden sich von den entsprechenden Spektren in 6M Gu-HCl (gestrichelte Linie) nur geringfügig. In Guanidin zeigte das T3-Spektrum eine leichte Rot-Verschiebung und sowohl rCOMP, als auch mCOMP eine geringe Blau-Verschiebung.

Die Absorption von T3 wurde in 6M Gu-HCl und in 20mM Phosphat pH 6,5 (Abb. 21A), von rCOMP in TBS (Abb. 21B) oder von mCOMP in 5mM Tris-HCL, pH 7,4 (Abb. 21C) aufgezeichnet. Nichtdenaturiertes T3 zeigte eine 1,8% geringere, rCOMP eine 2,6% höhere und mCOMP eine 1% geringere Absorption als das entsprechende Protein in 6M Gu-HCl (Prozentwerte bezogen auf die *in silico* berechneten Werte). Die genannten Abweichungen liegen im Bereich der abgeschätzten Pipettierfehler, weshalb die mit PROTPARAM berechneten Extinktionskoeffizienten (Tab. 3) den weiteren Quantifizierungen zugrunde gelegt wurden.

Tab. 3: Extinktionskoeffizienten des rekombinanten COMP

rekombinantes Protein	Aminosäuren (Anzahl)	Anzahl von: Trp / Tyr / Cys	theor. MW der Primärsequenz (kDa)	mol. Extinktionskoeff. ϵ_{280} (cm ² mol ⁻¹)	
				<i>in silico</i>	gemessen
rCOMP / D469Δ	740 / 739	10 / 11 / 45	81,07 / 80,95	73620	75590
rCOMP / D469Δ: Ψ-Monom.	680 / 679	10 / 11 / 43	74,46 / 74,35	73500	//
D361Y	740	10 / 12 / 45	81,11	74900	//
D361Y: Ψ-Monomer	680	10 / 12 / 43	74,51	74780	//
mCOMP	671	10 / 11 / 43	73,47	73500	74210
EGF-T3	302	2 / 0 / 23	32,57	12700	//
T3 / T3-D469Δ	261 / 260	1 / 0 / 17	28,34 / 28,22	6650	6530
T3-D361Y	261	1 / 1 / 17	28,39	7930	//
T3-7x	235	1 / 0 / 14	25,26	6530	//

Die Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten wurden für die nichtglykosilierten, reifen Proteine (ohne Signalpeptid) mit dem Programm PROTPARAM berechnet (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

3.10 UV-Spektroskopie zur Beurteilung der Aggregation

In einer Lösung streuen Makromoleküle und Partikel einfallendes Licht. Die Intensität dieser Lichtstreuung (Trübung) steigt quadratisch mit der Masse bzw. Größe der Teilchen und ist mit λ^{-4} von der Wellenlänge des einstrahlenden Lichts abhängig; mit geeigneten Geräten können Streuwinkel und zugehörige Streuintensität erfasst werden, um daraus die Größe und Form der Teilchen zu berechnen (Brunner und Dransfeld, 1983). Da die aromatischen Aminosäuren im Bereich oberhalb 310nm kein Licht absorbieren, kann aus der Absorption im langwelligen Bereich auf die vorhandene Lichtstreuung, und damit auf das Vorhandensein von Aggregaten in der untersuchten Probe zurückgeschlossen werden. Darüber hinaus lässt sich die Trübungskurve auf 280nm extrapolieren, um den Beitrag der Lichtstreuung zur gemessenen Extinktion bei 280nm zu bestimmen. Damit lassen sich gegebenenfalls Messwerte der Proteinquantifizierung korrigieren.

Es wurde untersucht, ob COMP unter den Bedingungen der CD-, Fluoreszenz- und Bindungsstudien durch Zugabe von Calcium- oder Zinksalzen aggregiert. Dazu wurden Proben in verschiedenen Puffern mit CaCl₂ bzw. ZnCl₂ gemischt und die Spektren im Bereich von 240-350 oder 250-450nm aufgezeichnet.

Ca²⁺-induzierte Aggregation von COMP

Die Pentamere rCOMP, D361Y, D469Δ und bovines tCOMP wurden in TBS ohne Ca²⁺, mit 0,25mM und mit 1,5mM CaCl₂ für 40 min bei RT inkubiert. Kein Protein aggregierte in TBS (Abb. 22A); auch nach Präinkubation in TBS + 0,25mM Ca²⁺ war keine Trübung feststellbar (Daten nicht gezeigt). In Gegenwart von 1,5mM Ca²⁺ (Abb. 22B) zeigten mit Ausnahme von rCOMP (durchgezogene Linie) alle untersuchten Proteine eine ausgeprägte Aggregation; die Trübung war bei D469Δ am deutlichsten ausgeprägt (gestrichelte Linie, Abb. 22B) und schwächer bei tCOMP (unterbrochen-gestrichelte Linie, Abb. 22B); relativ geringe Aggregation ließ sich bei D361Y feststellen (unterbrochene Linie, Abb. 22B).

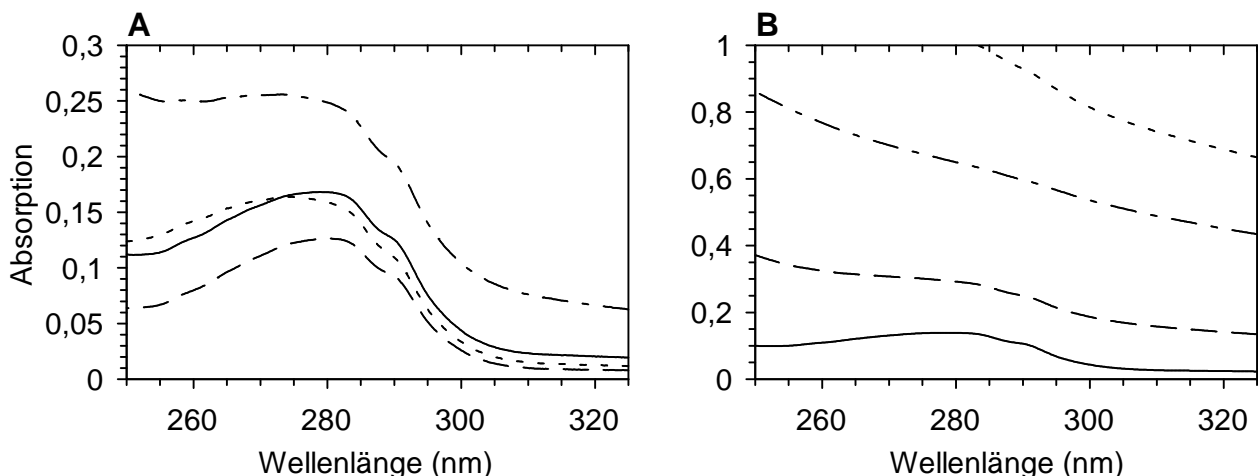


Abb. 22: Aggregation von COMP. UV-Spektren von rCOMP (durchgezogene Linie), D361Y (unterbrochene Linie), D469Δ (gestrichelte Linie) und tCOMP (unterbrochen-gestrichelte Linie) wurden in TBS (A) oder TBS mit 1,5mM Ca²⁺ (B) aufgezeichnet. In TBS waren keine Aggregate vorhanden (A); mit Ausnahme von rCOMP zeigten alle Proteine eine deutliche Aggregation in Gegenwart von 1,5mM Ca²⁺ (B). (Proteinkonzentration: 0,13-0,15mg/ml)

Der Einfluss von Zn²⁺ auf die COMP-Aggregation

Es wurde untersucht, ob die Aggregation von COMP durch Zink beeinflusst wird; hierzu wurden Bedingungen gewählt, wie sie in den Festphasen-Liganden-Bindungsexperimenten (s.u.) herrschten: 10-16μg/ml Protein in TBS, in TBS mit 0,5mM Zn²⁺, in TBS mit 0,5mM Zn²⁺ und 2mM Ca²⁺ oder in TBS mit 2mM Zn²⁺ und 2mM Ca²⁺. Dabei erfolgte die Zugabe von Zn²⁺ bzw. Ca²⁺ sequentiell, und nach jedem Pipettierschritt wurden nach 1, 5 und 15 min die Spektren bei RT aufgezeichnet.

In Übereinstimmung mit den in Abbildung 22 gezeigten Ergebnissen aggregierte keines der Proteine in TBS (Abb. 23A-E, durchgezogene Linie). Nach Zusatz von 0,5mM Zn²⁺ (gestrichelte Linie) ließ sich nur im Falle der Mutante D469Δ eine leichte Lichtstreuung beobachten (Abb. 23C). Erst in TBS mit 0,5mM Zn²⁺ und 2mM Ca²⁺ zeigte sich bei allen Proteinen Aggregation (Abb. 23A-E, unterbrochene Linie), die im Zeitverlauf kaum weiter zunahm (Daten nicht gezeigt); das monomere mCOMP (Abb. 23E, unterbrochene Linie) zeigte die geringste Trübung. Nach Zugabe von weiterem Zink ad 2mM Zn²⁺ und 2mM Ca²⁺ war die Lichtstreuung bei allen Proteinen außer mCOMP sehr ausgeprägt und nahm zeitlich noch weiter zu;

gezeigt sind hier die UV-Spektren nach 15 min. (Abb. 23A-E, unterbrochen-gestrichelte Linie). Es fällt auf, daß die Mutante D361Y (Abb. 23B) hier am stärksten aggregierte, in dem in Abbildung 22B dargestellten Experiment aber D469Δ die ausgeprägteste Aggregation in 1,5mM Ca^{2+} aufwies.

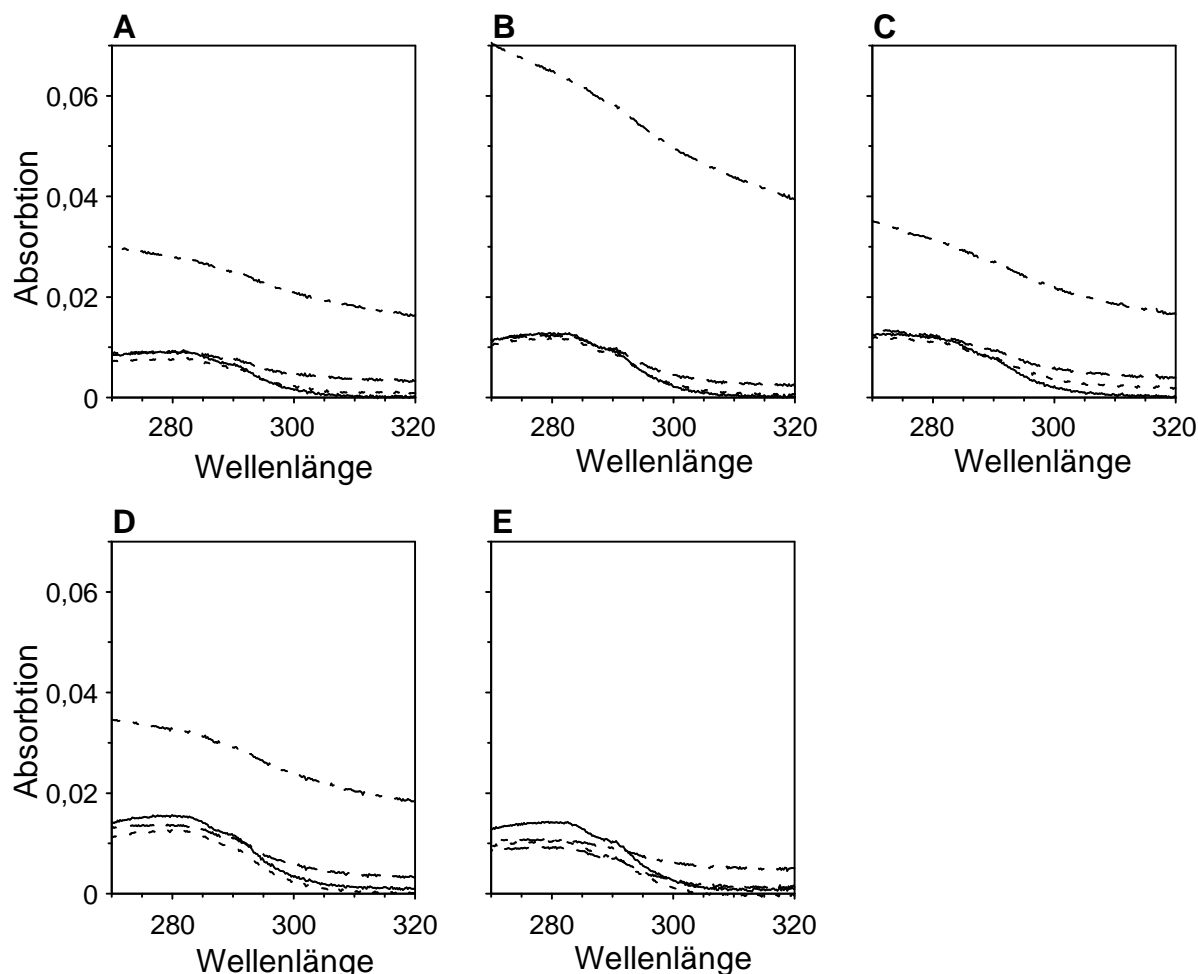


Abb. 23: Einfluss von Zink auf die Protein-Aggregation. Gezeigt sind die UV-Spektren von rCOMP (A), D361Y (B), D469Δ (C), tCOMP (D) und mCOMP (E): In TBS (Linie) aggregierte kein Konstrukt, mit 0,5mM Zn^{2+} (gestrichelte Linie) zeigte nur D469Δ (C) minimale Lichtstreuung. Außer mCOMP (E) aggregierten in Gegenwart von 0,5mM Zn^{2+} und 2mM Ca^{2+} (unterbrochene Linie) alle Proteine. In TBS mit 2mM Zn^{2+} und 2mM Ca^{2+} (unterbrochen-gestrichelte Linie) zeigten alle COMP-Konstrukte deutliche Lichtstreuung, die bei mCOMP (E) am schwächsten war. (Proteinkonzentration: 10-16μg/ml).

Insgesamt ließ sich bei der Aufreinigung und bei der Durchführung unzähliger CD-, UV- und Fluoreszenzmessungen mit EGF-T3, T3 und den T3-Mutanten nie Aggregation bzw. Lichtstreuung beobachten, selbst bei Ca^{2+} -Konzentrationen bis zu 24mM (Daten nicht gezeigt); bei diesen Konstrukten konnte durch EDTA-Zugabe die Wirkung von Ca^{2+} aufgehoben werden. Dagegen zeigten rCOMP, mCOMP, D361Y, D469Δ sowie die Ψ-Monomere und das aus Knorpel isolierte tCOMP bei Raumtemperatur eine Ca^{2+} -induzierte Aggregation, die teilweise mit bloßem Auge als leichte Opazität, manchmal sogar als makroskopische Partikelbildung wahrnehmbar war. Die Tendenz zur Bildung von Aggregaten war bei den Oligomeren immer ausgeprägter als bei Monomeren; das Phänomen zeichnete sich durch geringe

Reproduzierbarkeit aus. So zeigte in anderen Experimenten auch rCOMP in Gegenwart von 1,5mM Ca^{2+} deutliche Aggregation (Daten nicht gezeigt; vgl. auch Abb. 22B). In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, daß viele Aggregations- und Selbstassoziationsvorgänge erst oberhalb eines scharfen Konzentrations- oder Temperatur-Schwellenwertes spontan ablaufen.

3.11 Analyse der Sekundärstruktur durch CD-Spektroskopie

Zur Klärung der Frage, ob die Zugabe von Calcium zu messbaren Veränderungen der Sekundärstruktur von COMP führt, wurden CD-Spektren in Abwesenheit und in Anwesenheit von Ca^{2+} aufgezeichnet. Die Spektren wurden auf die spezifische Elliptizität normiert und mit Programmen analysiert, die die Konformation des zu prüfenden Proteins durch Vergleich mit den CD-Spektren von Proteinen bekannter Sekundärstruktur zu ermitteln versuchen.

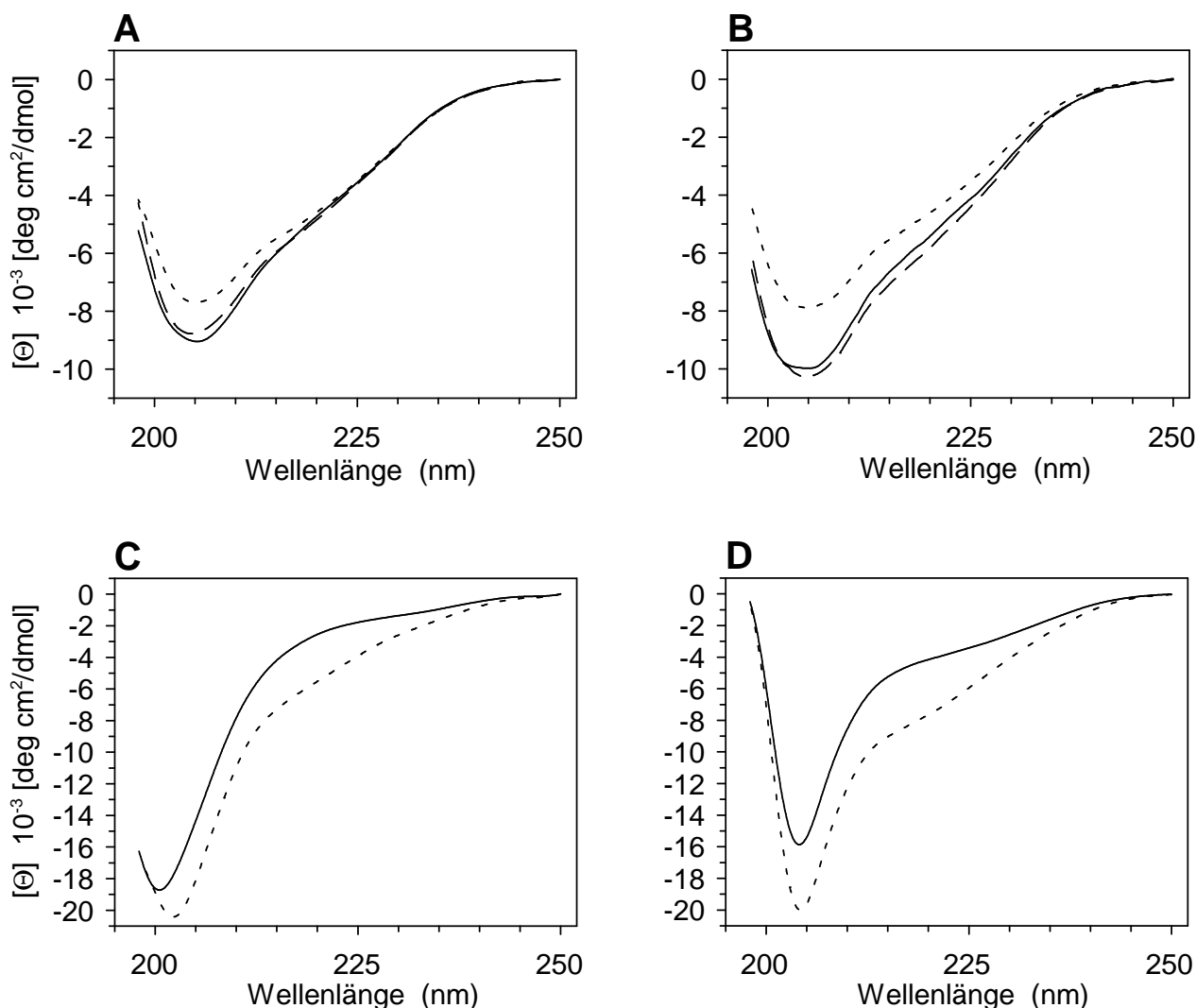


Abb. 24: CD-Spektren von Wildtyp COMP. tCOMP aus bovinem Knorpel (A), rCOMP (B), EGF-T3 (C) und T3 (D) wurden in Abwesenheit von Calcium (durchgezogene Linie), in Gegenwart von 0,25mM Ca^{2+} (gestrichelt) oder von 1,5mM Ca^{2+} (gepunktet) in TBS gemessen. Die Zunahme der Elliptizität bei 1,5mM Ca^{2+} war Folge der Lichtstreuung, die durch irreversible Aggregation des pentameren tCOMP und rCOMP (A, B) verursacht wurde.

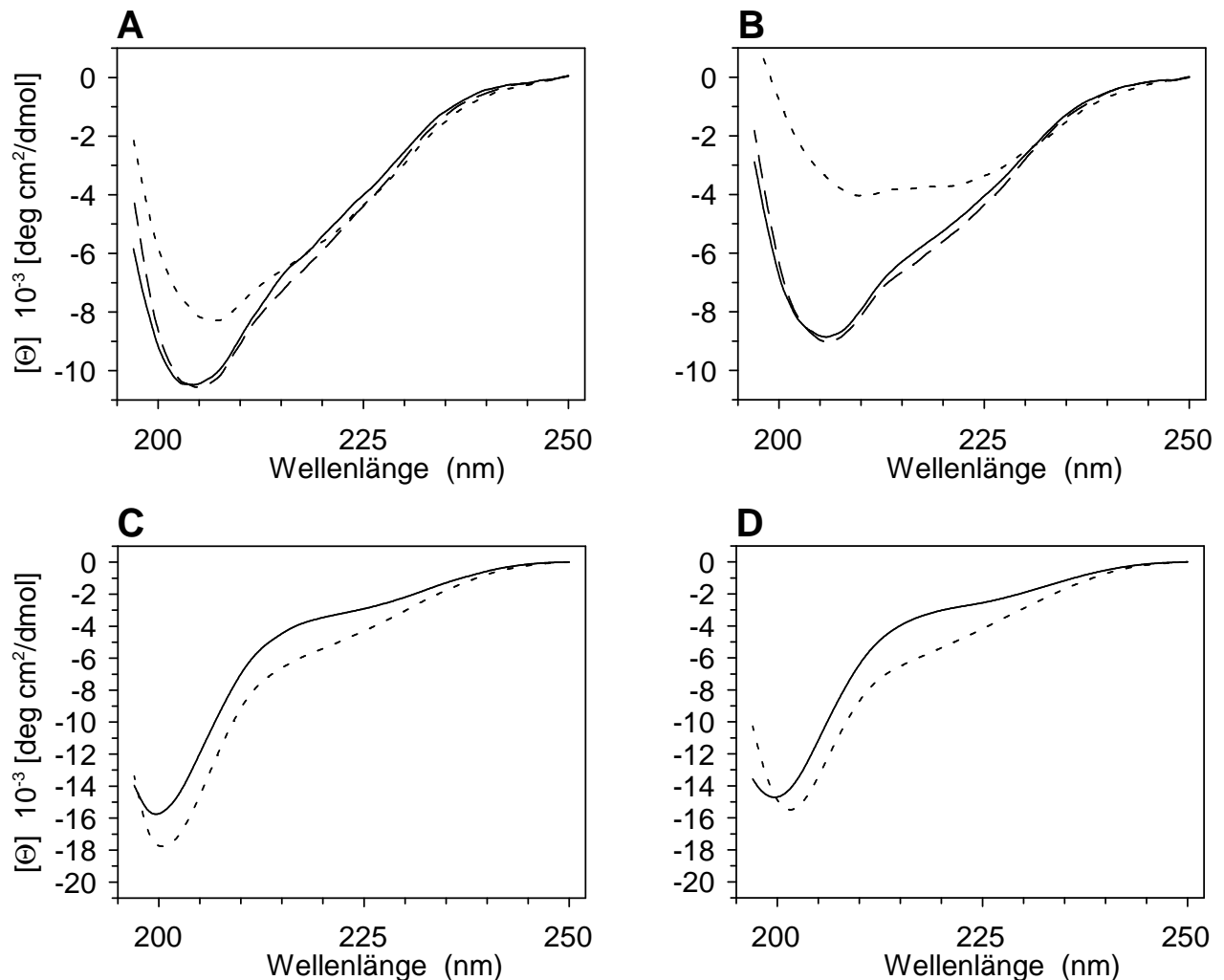


Abb. 25: Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderungen in mutiertem COMP. CD-Spektren von D361Y (A), D469 Δ (B), T3-D361Y (C) und T3-D469 Δ (D) wurden in Abwesenheit (durchgezogene Linien), in Gegenwart von 0,25mM Ca^{2+} (gestrichelt) und 1,5mM Ca^{2+} (gepunktet) in TBS aufgezeichnet. Die irreversible Zunahme der Elliptizität in Anwesenheit von 1,5mM Ca^{2+} war bei den pentameren Proteinen (A, B) Folge der Aggregations-bedingten Trübung, während die Abnahme der Elliptizität bei T3-D361Y und T3-D469 Δ (C, D) durch Zugabe von EDTA vollständig reversibel war (vgl. auch Abb. 26 und Abb. 28).

Die CD-Spektren der Vollängekonstrukte zeigten bei Zugabe von 1,5mM Ca^{2+} eine Zunahme der Elliptizität (der Betrag des Signals verringerte sich: Abb. 24A, B; Abb. 25A, B), die durch EDTA-Zugabe nicht reversibel war. Die UV-Spektren vor und nach den CD-Messungen zeigten, daß dieses Phänomen auf Lichtstreuung zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt; vgl. 3.10). Daher ließen sich die CD-Spektren von Ca^{2+} -gesättigtem rCOMP, tCOMP, D361Y und D469 Δ nicht analysieren.

Unter Ca^{2+} -freien Bedingungen unterschieden sich die CD-Spektren des pentameren Wildtyps und der Mutanten nicht signifikant (Abb. 24A, B; Abb. 25A, B); daher wurde auf eine gesonderte Analyse der Sekundärstrukturen von D361Y und D469 Δ verzichtet. Demgegenüber zeigten T3 und EGF-T3 nach Zugabe von 0,25mM und 1,5mM Ca^{2+} eine Verringerung der Elliptizität (der Betrag des Signals erhöhte sich: Abb. 24C, D); dieser Effekt war durch EDTA-Zugabe vollständig reversibel (vgl. Abb. 26, 28).

Die COMP Konstrukte T3-D361Y und T3-D469Δ verhielten sich in Gegenwart von Ca^{2+} qualitativ wie Wildtyp T3 (Abb. 25C, D); quantitativ betrachtet war der Betrag der Elliptizität und die Signaländerung im Bereich der Schulter von 215-225nm bei T3-D361Y und T3-D469Δ signifikant geringer als bei T3 (Abb. 24D, Abb. 25C, D; vgl. auch Abb. 41 in der Diskussion, Kapitel 4.3).

Tab. 4: Sekundärstruktur-Elemente der COMP-Konstrukte

Protein	mM Ca^{2+}	Selcon / KS				Selcon / 33				Contin / #2				K2D		
		α	β	t	o	α	β	t	o	α	β	t	o	α	β	o
rCOMP	0,02	14	33	28	22	10	31	26	34	16	50	24	10	8	41	51
rCOMP Ψ -Monom.	0,02	7	40	25	25	4	34	28	33	8	55	24	13	7	51	42
EGF-T3	0,02	10	31	33	27	14	21	29	36	12	27	22	39	9	17	74
T3	0,005	10	31	29	29	4	27	35	34	7	16	8	68	5	37	57
T3-D361Y	0,005	10	31	29	28	5	25	35	34	8	17	8	67	5	36	59
T3-D469Δ	0,005	10	33	29	30	6	28	32	33	8	18	10	65	6	38	56
EGF-T3	2,4	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	8	29	40	22	15	38	15	32	27	32	40
T3	24,3	17	26	32	24	10	25	33	32	10	30	6	55	26	32	42
T3-D361Y	24,3	18	25	30	25	11	22	32	35	8	20	0	71	23	31	47
T3-D469Δ	24,3	16	27	32	26	9	25	34	32	11	30	7	53	21	30	49

Die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente, die den CD-Spektren zugrundeliegen, wurden in einer computergestützten Analyse bestimmt. α = alpha-Helix; β = beta-Faltblatt; t = Schleifen (*turn*); o = Summe ungeordneter und nicht bestimmter Sekundärstrukturelemente (*other*); ϕ = nicht bestimmbar, da Selcon die Analyse abbrach. Die Analysen wurden mit verschiedenen Datensätzen durchgeführt: Selcon / KS = 17 Referenzspektren (berechnet nach Kabsch und Sander, 1983); Selcon / 33 = 33 Referenzspektren (berechnet nach Johnson, 1990); Contin / #2 = 16 Referenzspektren und 4 Spektren von denaturierten Proteinen als Modell für ungeordnete Bereiche (Sekundärstrukturen berechnet nach Kabsch und Sander, 1983; denaturierte Proteine einbezogen nach Venyaminov *et al.*, 1993). Die CD-Spektren von EGF-T3 wurden in TBS, alle anderen in 5mM Tris -HCl, pH 7,4, aufgezeichnet.

Die Auswertung der CD-Spektren zur Bestimmung der Sekundärstrukturelemente erfolgte mit den Computerprogrammen Selcon (Sreerama und Woody, 1993), Contin (Provencher und Glöckner, 1981) und K2D (Andrade *et al.*, 1993). Alle Programme ermittelten ein von β -Faltblatt dominiertes CD-Spektrum mit hohem bis sehr hohem Anteil ungeordneter Struktur bei allen untersuchten Proteinen (Tab. 4). Die Proteine EGF-T3 und T3 besaßen in Gegenwart von Ca^{2+} einen höheren Anteil an α -Helix und meist weniger ungeordnete Strukturbereiche, als in Abwesenheit von Ca^{2+} . Das CD-Spektrum von EGF-T3 in TBS + 2,4mM Ca^{2+} ließ sich durch Selcon nur mit dem Datensatz aus 33 Referenzspektren auswerten; mit dem Datensatz aus 17 Referenzen brach das Programm die Auswertung ab.

Rekombinantes und aus Knorpel extrahiertes Vollängen-COMP unterschieden sich in einigen Experimenten in ihren spezifischen Elliptizitäten bei gleichem Kurvenverlauf. Durch Streckung oder Stauchung ließen sich beide Spektren zur Deckung bringen, was nicht für Unterschiede in der Sekundärstruktur spricht, sondern mehr die Variabilität der Konzentration durch den experimentell schwankenden Umfang von Aggregationsvorgängen (vgl. 3.10 und Abb. 22, 23) widerspiegelt.

3.12 Der Ca^{2+} -induzierte Konformationswechsel der Typ 3 Domäne

Betrachtet man die Ca^{2+} -abhängige Änderung der Elliptizität und Fluoreszenz als Folge der Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung, können beide Methoden zur Charakterisierung dieser Bindung eingesetzt werden. Zur Berechnung des Protein-gebundenen Ca^{2+} wurde aufgrund der Sequenzhomologie von COMP zu Thrombospondin 1 die für das letztere gezeigte Anzahl von 11 Ca^{2+} -Bindungsstellen im Bereich der Typ 3 Domäne beim Wildtyp angenommen (Misenheimer und Mosher, 1995) und 10 Bindungsstellen für die Mutanten eingesetzt (die eigenen Messungen durch Gleichgewichts-Dialyse - vgl. Kapitel 3.13 - wurden erst später durchgeführt). Kontrollrechnungen mit 10-20 Ca^{2+} -Bindungsstellen in den Wildtyp Typ 3 Motiven oder 4-10 Bindungsstellen bei den Mutanten zeigten keine signifikanten Änderungen der freien Ca^{2+} -Konzentration und der ermittelten Parameter bei Anpassung der Bindungsmodelle.

3.12.1 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren von EGF-T3 und der T3-Proteine wurden bei 215nm (stärkste absolute Signaländerung bei Ca^{2+} -Zugabe) und teilweise bei 222nm (charakteristisch für α -Helix) ausgewertet und gegen die freie Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen. Mittels nichtlinearer Näherung wurde eine Kurvenanpassung durchgeführt, bis die Kurve und ihre Parameter (K_d und n_H) die Messwerte bestmöglich beschrieben.

In Abbildung 26 sind die Spektren der Titration von EGF-T3 mit Calcium dargestellt, das Ergebnis der dazugehörigen Kurvenanpassung zeigt Abbildung 27. Die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung von EGF-T3 war durch Chelatisierung des Ca^{2+} mit EDTA vollständig reversibel (Abb. 26, dick gestrichelt). Ein Modell, das eine einzige Klasse kooperativer Bindungsstellen berücksichtigte, konnte die gemessenen Werte zufriedenstellend beschreiben (Abb. 27) und ergab eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante EGF-T3/ Ca^{2+} von $K_d = 0,26$ mM bei hoher Kooperativität, ausgedrückt durch den Hill-Koeffizienten $n_H = 3$. Die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung verursachte bei 215nm eine Elliptizitätsänderung von 45%.

Die Auswertung der Signaländerung von EGF-T3 ergab mit dem gleichen kooperativen Bindungsmodell bei 222nm vergleichbare Parameter: Eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante $K_d = 0,24$ mM und einen Hill-Koeffizient $n_H = 3,2$ (Abb. 27, Einsatz). Die Änderung des CD-Signals zwischen Ca^{2+} -freiem und Ca^{2+} -gesättigtem Zustand betrug in diesem Fall 60%.

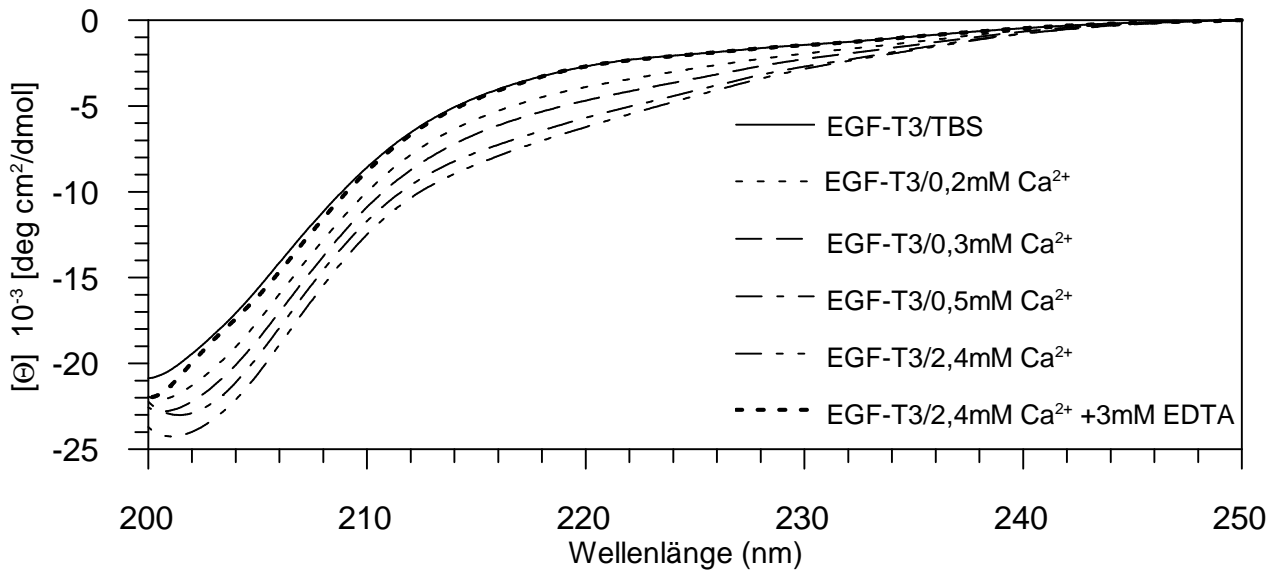


Abb. 26: Circular Dichroismus der Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung von EGF-T3: Die CD-Spektren von EGF-T3 wurden in TBS mit ansteigenden Konzentrationen Ca^{2+} aufgezeichnet. Die Elliptizität nimmt bei Zugabe von Ca^{2+} ab; die größte Signaländerung findet im Bereich zwischen 0,1mM und 0,5mM Ca^{2+} statt. Durch Ca^{2+} -Chelatisierung mit EDTA lässt sich die Konformationsänderung wieder aufheben.

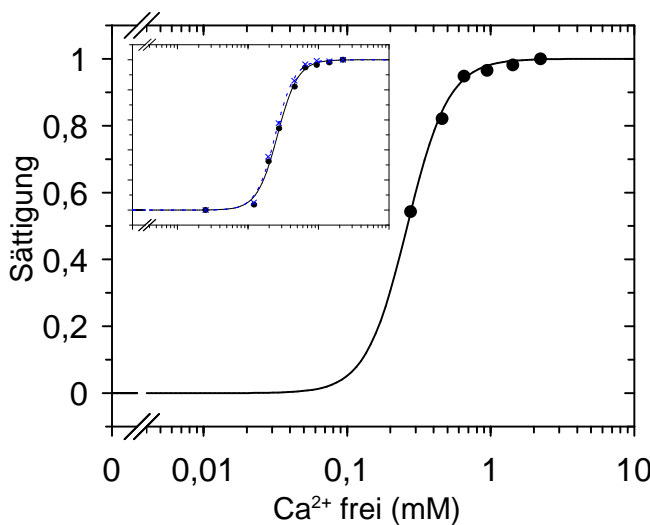


Abb. 27: Quantitative Auswertung der Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung von EGF-T3. Die CD-Spektren wurden in TBS nach sequentieller Zugabe von CaCl_2 aufgezeichnet und die relative Änderung des Circular Dichroismus bei 215nm gegen die freie Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen. Die Anpassung erfolgte mit einem kooperativen Bindungsmodell, dem eine einzige Klasse von Ca^{2+} -Bindungsstellen zugrundeliegt, und ergab: $K_d = 0,26 \text{ mM}$ Ca^{2+} mit: $n_H = 3,02$.

Einsatz: Vergleich der Auswertungen bei 215nm und 222nm. Die 222nm-Werte (Kreuze) und die zugehörige Kurvenanpassung (unterbrochene Linie) unterschieden sich nicht signifikant von den bei 215nm ermittelten Werten.

In analoger Weise wurden die Fragmente T3 (Abb. 28, Abb. 29), T3-D361Y und T3-D469Δ mit Ca^{2+} titriert (Abb. 29). Die Elliptizität bei 215nm änderte sich vom Ca^{2+} -freiem zum Ca^{2+} -gesättigtem Zustand bei T3 um 50%, bei den beiden Mutanten lag die Änderung mit 40% deutlich niedriger (Tab. 6).

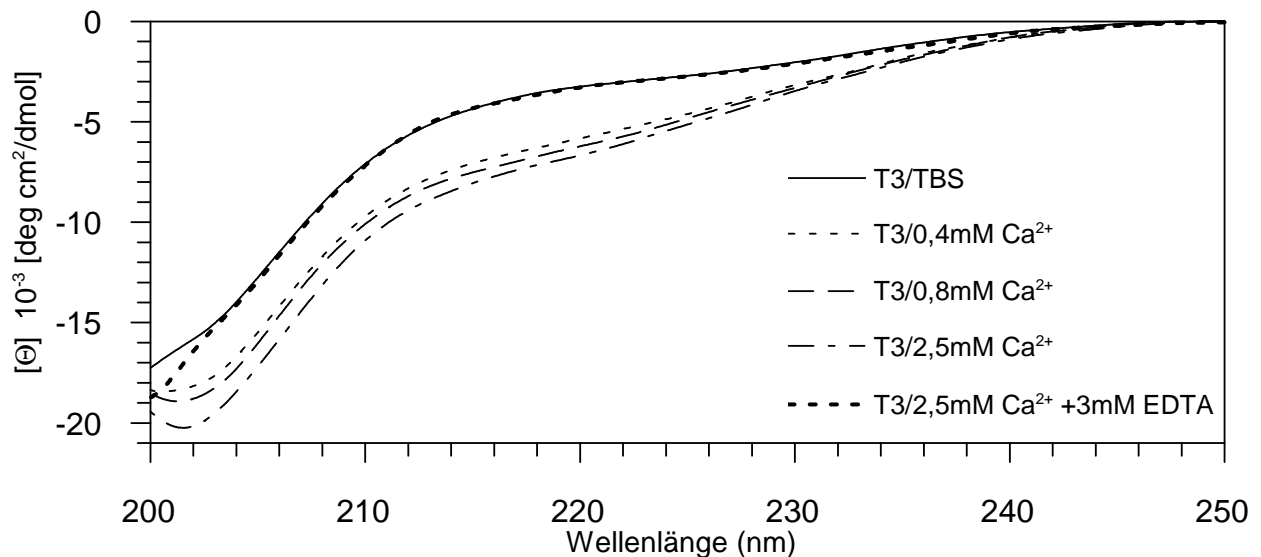


Abb. 28: Circular Dichroismus der Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung der Typ 3 Motive von COMP:

Die CD-Spektren der T3- Fragmente wurden in TBS nach sequentieller Zugabe von Ca^{2+} aufgezeichnet. Die Elliptizität nimmt bei Zugabe von Ca^{2+} ab; diese Konformationsänderung ist durch Chelatisierung des Ca^{2+} mit EDTA vollständig reversibel.

Die Anpassung der Parameter an die Messwerte wurde mit zwei verschiedenen Modellen getestet: Mit einem Modell, das (wie bei EGF-T3) nur eine Klasse von Bindungsstellen berücksichtigt, ließen sich die beobachteten Messwerte nur mangelhaft beschreiben (Abb. 30C, D). Ein Modell, das zwei verschieden affine, unabhängige Typen von Ca^{2+} -Bindungsstellen berücksichtigt, ergab Kurvenanpassungen, die zufriedenstellend die Messwerte beschrieben (Abb. 30A, B). Offensichtlich lässt sich die Elliptizitätsänderung der Typ 3 Motive nur durch eine biphasische Ca^{2+} -Bindungskurve beschreiben.

Die Kurvenanpassung ergab, daß die Elliptizitätsänderung bei 215nm bei der Wildtyp Typ 3 Domäne (T3) zu 80% auf eine hochaffine, hoch kooperative Ca^{2+} -Bindung ($K_{d1} = 0,30\text{mM}$, $n_{H1} = 3,7$) und zu 20% auf eine niederaffine, schwach kooperative Bindung zurückzuführen ist ($K_{d2} = 4,1\text{mM}$, $n_{H2} = 1,2$).

Die D361Y-Mutation im vierten Typ 3 Motiv resultierte bei T3-D361Y in einer gleichmäßigen Aufteilung der Signale (je 50%) auf eine hochaffine, hochkooperative Ca^{2+} -Bindung ($K_{d1} = 0,25\text{mM}$ und $n_{H1} = 4,5$) und eine niederaffine, gering kooperative Ca^{2+} -Bindung ($K_{d2} = 2,7\text{mM}$ Ca^{2+} und $n_{H2} = 1,5$). Durch die Mutation D361Y reduziert sich also der Umfang der Konformationsänderung (40% statt 50% wie bei T3), und einige hochaffine Ca^{2+} -Bindungsstellen gehen verloren oder werden in niederaffine umgewandelt.

Die Deletion im siebten Typ 3 Motiv führte bei T3-D469Δ im Vergleich zu T3 zu einer geringen Verschiebung der Signalanteile: 70% der Elliptizitätsänderung bei 215nm wurden durch hochaffine, hochkooperative Ca^{2+} -Bindung verursacht ($K_{d1} = 0,28\text{mM}$, $n_{H1} = 3,7$) und die niederaffine Ca^{2+} -Bindung ($K_{d2} = 1,5\text{mM}$, $n_{H2} = 2,8$) trug nur mit 30% zur Gesamtänderung bei (vgl. Kapitel 3.14, Tab. 6). Die Mutation im siebten Typ 3 Motiv verursacht also ebenfalls den Verlust eines Teils der hochaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen oder ihre Umwandlung in niederaffine Bindungsstellen, und letztere tragen bei der Mutante stärker zur Konformationsänderung bei.

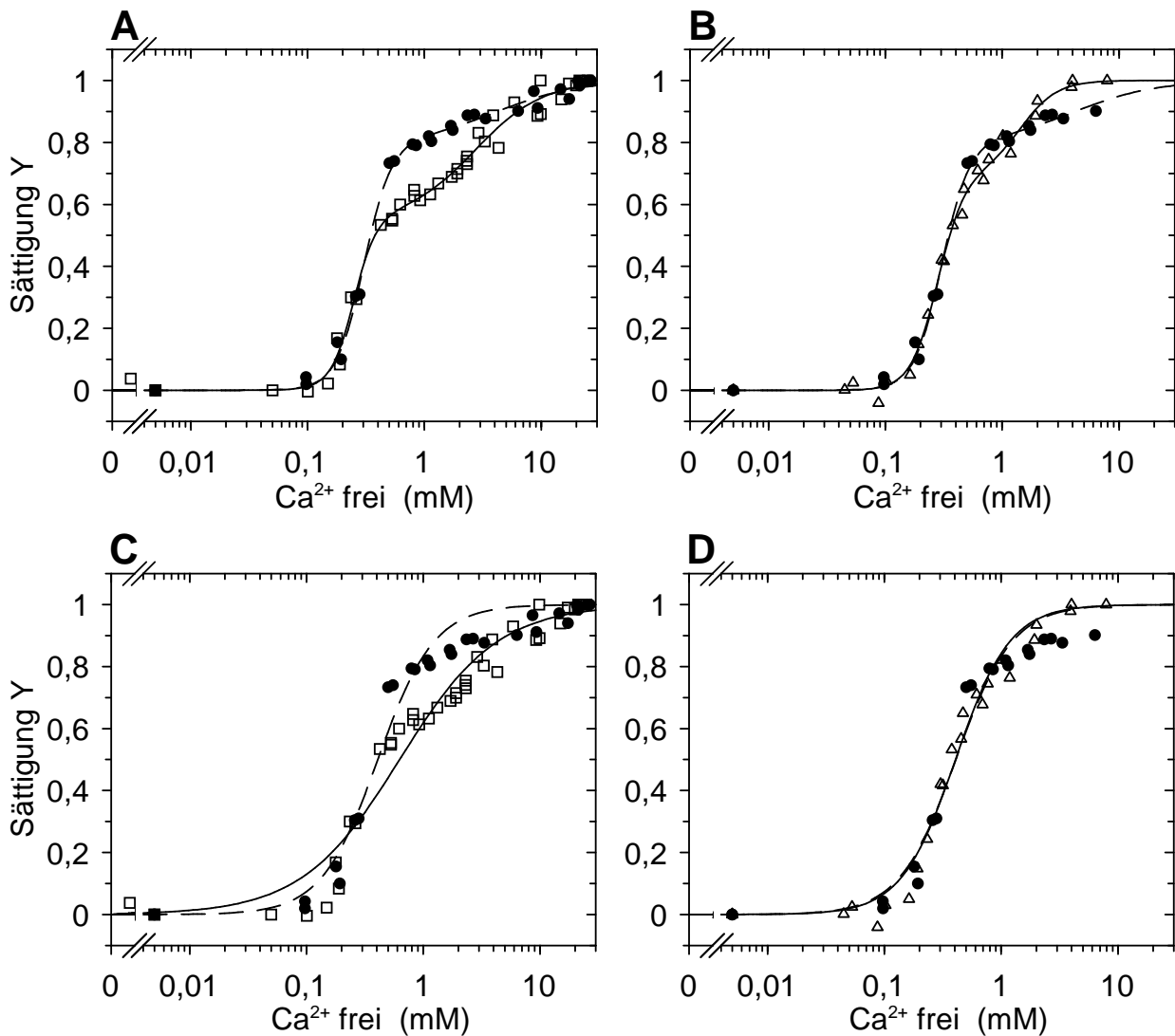


Abb. 29: Quantitative Analyse der Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderungen in den Typ 3 Motiven. Die CD-Spektren wurden in TBS nach sequentieller Zugabe von CaCl_2 aufgezeichnet. Die relative Änderung der Elliptizität bei 215nm wurde gegen die freie Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen; T3 (gefüllte Kreise), T3-D361Y (A,C offene Quadrate) und T3-D469Δ (B,D offene Dreiecke). In A und B wurde ein Modell mit zwei verschiedenen affinen, kooperativen Ca^{2+} -Bindungsstellen eingesetzt. In C und D ließ das Modell nur eine Klasse kooperativer Bindungsstellen mit einer einzigen Affinität zu, um die selben Daten wie in A und B anzupassen. Die Kurvenanpassungen von T3 (gestrichelte Linie), T3-D361Y (A, C: durchgezogene Linie) und T3-D469Δ (B, D: durchgezogene Linie) führen zu einem zufriedenstellenden Ergebnis, wenn zwei verschieden affine, kooperative Bindungsstellen zugelassen werden (A, B). Die Werte stammen aus jeweils drei unabhängigen Titrationsen.

Die Auswertung der Signaländerung bei 222nm ergab im Vergleich zur Auswertung der Elliptizitätsänderung bei 215nm keine deutlich verschiedenen Werte der Ca^{2+} -Bindung:

T3	85% des Signals mit $K_{d1} = 0,30 \text{ mM}$, $n_{H1} = 3,7$	15% mit $K_{d2} = 5,35 \text{ mM}$, $n_{H2} = 1,8$
T3-D361Y	60% des Signals mit $K_{d1} = 0,24 \text{ mM}$, $n_{H1} = 4,2$	40% mit $K_{d2} = 2,79 \text{ mM}$, $n_{H2} = 1,6$
T3-D469Δ	50% des Signals mit $K_{d1} = 0,22 \text{ mM}$, $n_{H1} = 4,9$	50% mit $K_{d2} = 0,64 \text{ mM}$, $n_{H2} = 2,1$

3.12.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Das COMP-Fragment T3 enthält ein Tryptophan im dritten Typ 3 Motiv (Trp 344 bzw. W344) und kein Tyrosin; damit läßt sich die intrinsische Fluoreszenz bei 340-350nm eindeutig diesem Trp zuordnen. Bei T3-D361Y stellt das einzige Tyr gleichzeitig auch die in das vierte Typ 3 Motiv eingeführte Mutation dar; Trp und Tyr unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Fluoreszenzspektren und sind in der Primärsequenz 17 Peptidreste voneinander entfernt. Bei EGF-T3 befindet sich kurz vor dem Ende der EGF-Domäne noch ein zweites Trp, 85 Aminosäuren vor dem Trp344 (vgl. Tab. 3 und Sequenzkarte: Anhang 7.2).

Die Proteine EGF-T3, T3, T3-D361Y und T3-D469Δ zeigten in TBS ein Emissionsmaximum bei 353 (Excitation: 280nm) und ein Excitationsmaximum bei 280-281nm (Emission: 350nm). Die Zugabe von Zn^{2+} veränderte weder die Lage dieser Maxima, noch die Fluoreszenzintensität (Daten nicht gezeigt). Pentameres COMP zeigte in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} oder EDTA nicht-reproduzierbare, vermutlich aggregationsbedingte Änderungen der Fluoreszenzintensität. Bei monomerem mCOMP ließ sich bei hohen Zn^{2+} - oder Ca^{2+} -Konzentrationen eine geringe, mit EDTA nur teil-reversible Reduktion der Fluoreszenzintensität beobachten (Daten nicht gezeigt). Die Pentamere und mCOMP konnten daher spektroskopisch nicht genauer analysiert werden.

Der Einfluß von Calcium auf die Fluoreszenz

Im Ca^{2+} -freien Zustand zeigten die T3-Konstrukte eine vergleichbare Intensität der bei 350nm emittierten Fluoreszenz und ihr Emissionsmaximum lag übereinstimmend bei 353nm (vgl. Tab. 5, Abb. 30).

Ein sehr differenziertes Bild ergab die Fluoreszenzmessung bei Ca^{2+} -Sättigung: Während sich die Emission - relativ zum Ca^{2+} -freien Zustand - bei EGF-T3 um 571% und T3 um 488% änderte, zeigten die T3-Mutanten eine reduzierte Signaländerung: Bei T3-D469Δ änderte sich durch Zugabe von Ca^{2+} das Fluoreszenzsignal um 316%, bei T3-D361Y sogar nur um 18%. In Gegenwart von Ca^{2+} zeigten T3 (7nm) und T3-D469Δ (3nm) eine deutliche Blauverschiebung des Emissionsmaximum (Tab. 5, Abb. 30).

Tab. 5: Messung der intrinsischen Fluoreszenz von EGF-T3, T3, T3-D361Y und T3-D469Δ.

	Fluoreszenzintensität bei 350nm: F_{350}		Fluoreszenzänderung bei 350nm: ΔF_{350}		Fluoreszenzmaximum λ_{max} (bei Anregung mit 280nm)		
	Ca-frei (Units/ μ M)	Ca-gesättigt (Units/ μ M)	$\Delta F_{350}/[Prot]$ (Units/ μ M)	$\Delta F/F_{Ca-gesättigt}$ %	Ca-frei (nm)	Ca-gesättigt (nm)	Änderung
EGF-T3	204	31	175	571	353	ϕ	ϕ
T3	175	30	144	488	353	346	7 nm
T3-D361Y	192	163	30	18	353	352	≤ 1 nm
T3-D469Δ	169	41	128	316	353	350	3 nm

Die bei 350nm emittierte Fluoreszenzintensität (F_{350}) von EGF-T3, T3, T3-D361Y und T3-D469Δ wurden in TBS aufgezeichnet (ϕ : nicht bestimmt); die Excitation erfolgte bei 280nm. Die Bestimmung der Lage des Emissions-Maximums λ_{max} erfolgte ebenfalls nach Anregung mit der Wellenlänge 280nm.

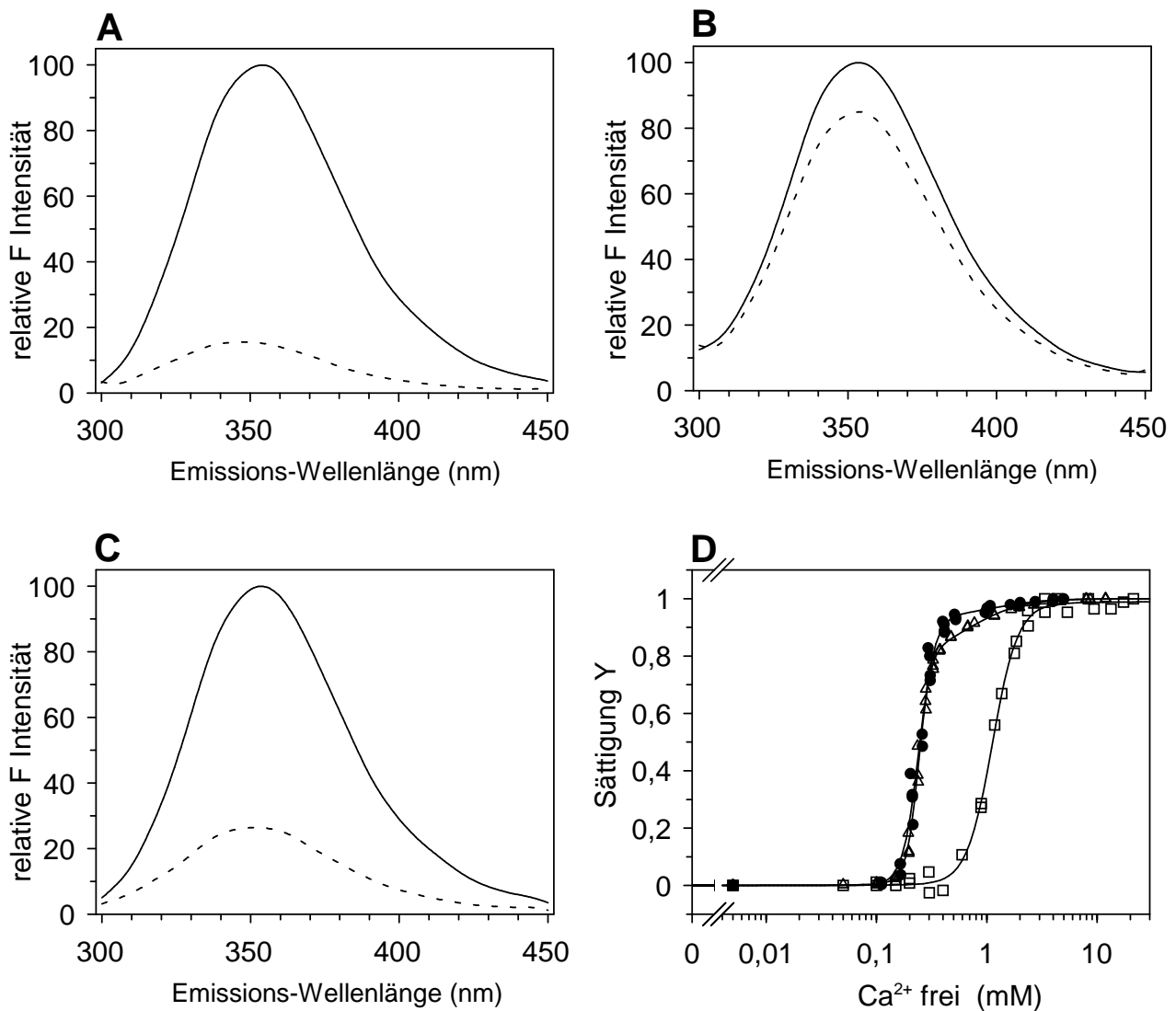


Abb. 30: Spektren der Ca²⁺-induzierten Fluoreszenzänderung der Typ 3 Domäne von COMP.

A-C: Fluoreszenzspektren von T3 (A), T3-D361Y (B), und T3-D469Δ (C) wurden in TBS ohne Ca²⁺ (durchgezogene Linie) oder mit 1,5mM Ca²⁺ aufgezeichnet (gestrichelte Linie); Excitation bei 280nm. Die Spektren wurden auf die jeweilige maximale Fluoreszenzintensität im Ca²⁺-freien Zustand normalisiert. Verglichen mit dem Wildtyp ist der Umfang der Ca²⁺-induzierten Fluoreszenz-Änderung bei T3-D361Y drastisch und bei T3-D469Δ deutlich reduziert.

D: Die relative Änderung der Fluoreszenzintensität von T3 (gefüllte Kreise), T3-D361Y (offene Quadrate) und T3-D469Δ (offene Dreiecke) wurde bei verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen in TBS aufgezeichnet (Emission: 350nm; Excitation: 280nm). Die Sättigung (relative Fluoreszenz-Änderung) wurde gegen die freie Ca²⁺-Konzentration aufgetragen und ein Modell mit 2 Klassen verschieden affiner, kooperativer Ca²⁺-Bindungsstellen an die Messwerte angepasst. Die Ca²⁺-Affinität von T3-D361Y ist erheblich reduziert.

Abhängigkeit der Fluoreszenz von der freien Ca²⁺-Konzentration

Die Interaktion von COMP mit Ca²⁺ wurde durch Messung der Fluoreszenz bei verschiedenen Ca²⁺-Konzentrationen untersucht und aus der Fluoreszenzänderung die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d bestimmt. Analog zur Auswertung der Elliptizitätsänderung bei den Ca²⁺-Titrationen wurde die Emission bei 350nm (Excitation: 280nm) auf die relative Signaländerung (Sättigung) umgerechnet und zur

freien Ca^{2+} -Konzentration in Bezug gesetzt. An die Messwerte wurde entweder ein Modell angepasst, dem eine Klasse kooperativer Ca^{2+} -Bindungsstellen zugrunde liegt, oder es kam ein Modell mit zwei Klassen von Ca^{2+} -Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität und Kooperativität zur Anwendung.

Die Ca^{2+} -induzierte Fluoreszenz-Änderung von T3-D361Y (Abb. 30D, offene Quadrate) konnte angemessen durch ein Bindungsmodell mit n Bindungsstellen gleicher Ca^{2+} -Affinität ($K_d = 1,12\text{mM Ca}^{2+}$) und hoher Kooperativität ($n_H = 3,8$) beschrieben werden.

Dagegen zeigte die Fluoreszenz-Änderung von T3-D469Δ (Abb. 30D, offene Dreiecke) einen biphasischen Verlauf und nur die Anpassung eines Bindungsmodell mit zwei verschieden affinen und kooperativen Ca^{2+} -Bindungsstellen konnte die Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung zufriedenstellend beschreiben: 80% der Signaländerung entfallen bei T3-D469Δ auf die hochaffine, hochkooperative Ca^{2+} -Bindung ($K_{d1} = 0,24\text{mM}$, $n_{H1} = 8$), die übrigen 20% der Änderung gehen auf Bindung niedrigerer Affinität und Kooperativität zurück ($K_{d2} = 0,69\text{mM}$, $n_{H2} = 1,9$).

Die Fluoreszenz-Änderung bei der Ca^{2+} -Titration des Wildtyps T3 (Abb. 30 D, gefüllte Kreise) zeigte eine schwach ausgeprägte Biphasigkeit der Ligandenbindung, die sich wie im Fall von T3-D469Δ unter Berücksichtigung verschieden affiner und kooperativer Ca^{2+} -Bindungsstellen beschreiben ließ: Bei T3 verursacht die hochkooperative und hochaffine Ca^{2+} -Bindung ($K_{d1} = 0,24\text{mM}$, $n_{H1} = 5,9$) 94% der Signaländerung, die restlichen 6% gehen auf eine niederaffine Bindung geringerer Kooperativität zurück ($K_{d2} = 1,25\text{mM}$, $n_{H2} = 2$).

Beitrag von Tryptophan und Tyrosin zur Gesamtfluoreszenz von T3-D361Y

Die geringe Änderung der Fluoreszenz von T3-D361Y in An- und Abwesenheit von Calcium lässt drei Erklärungen zu, die im Vorgriff auf die Diskussion schon hier erwähnt seien:

Entweder verursacht die Mutation eine Struktur-Veränderung der Typ 3 Domäne, die sich in einer verminderten Fluoreszenzänderung bei Ca^{2+} -Bindung äußert und es spielt keine Rolle, daß mit Tyr361 eine ebenfalls zur Fluoreszenz fähige Aminosäure eingeführt wurde. Alternativ ließe sich die Beobachtung dadurch erklären, daß das Trp344 die gleiche Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz-Änderung wie in T3 aufweist, aber diese von einer entgegengesetzt verlaufenden Fluoreszenz-Änderung des Tyr361 überlagert wird (mit steigender Ca^{2+} -Konzentration zunehmende F_{350}); wie unter 2.9 dargelegt, werden bei Anregung mit der Wellenlänge 280nm Tyr und Trp zur Fluoreszenz angeregt, es könnte sich in letzterem Fall die Summe vergleichsweise wenig ändern. Da sich die Emissionsspektren beider Aminosäuren überlappen, läßt sich meist nicht beurteilen, in welchem Maß das jeweilige Chromophor zum Gesamtsignal beiträgt. Wählt man jedoch eine Anregungs-Wellenlänge von $\geq 295\text{nm}$, fluoresziert nur Tryptophan. Durch Vergleich der Spektren nach Excitation bei 280nm und bei 295nm läßt sich der Beitrag von Trp bestimmen, die Differenz entspricht dann der Tyrosinfluoreszenz.

Auch bei Anregung mit 295nm zeigte T3-D361Y in An- und Abwesenheit von Calcium den gleichen, verglichen mit T3 drastisch reduzierten Umfang der Ca^{2+} -induzierten Änderung der Emission (Daten nicht gezeigt). Das eingeführte Tyr361 fluoresziert demnach nicht bei Excitation mit 280nm, d.h., die gesamte Emission lässt sich auf das singuläre Trp344 zurückführen.

3.13 Bestimmung der Anzahl von Ca^{2+} -Bindungsstellen durch Gleichgewichtsdialyse

Zur Bestimmung der Anzahl an Ca^{2+} -Bindungsstellen in der Typ 3 Domäne wurde eine Gleichgewichtsdialyse in Gegenwart von 1mM Ca^{2+} mit einer geringen Menge radioaktiven $^{45}\text{Ca}^{2+}$ durchgeführt. Das Konstrukt T3 wurde in vier unabhängigen Experimenten, die beiden Mutanten T3-D361Y und T3-D469Δ jeweils in zwei Versuchen untersucht. Nach Berechnung der proteingebundenen Radioaktivität und Umrechnung auf die Anzahl der Moleküle ergaben sich 12 ± 2 Ca^{2+} -Bindungsstellen in T3, 6 ± 2 Bindungsstellen in T3-D361Y und 8 ± 2 Ca^{2+} in T3-D469Δ (vgl. Tab. 6). Offensichtlich führen die Punktmutationen zum Verlust von mehreren Ca^{2+} -Bindungsstellen.

Eine Anzahl von 12 ± 2 Ca^{2+} -Bindungsstellen bei der Typ 3 Domäne des Wildtyps steht in Einklang mit dem von Lawler bzw. Misenheimer vorgeschlagenen Modell von 13 Ca^{2+} -Bindungsstellen, die in acht Typ 3 Motiven angeordnet sind (Lawler und Hynes, 1986); für das in weiten Bereichen homologe Thrombospondin 1 wurden auch tatsächlich 12 ± 1 Ca^{2+} -Bindungsstellen pro Polypeptidkette nachgewiesen (Misenheimer und Mosher, 1995).

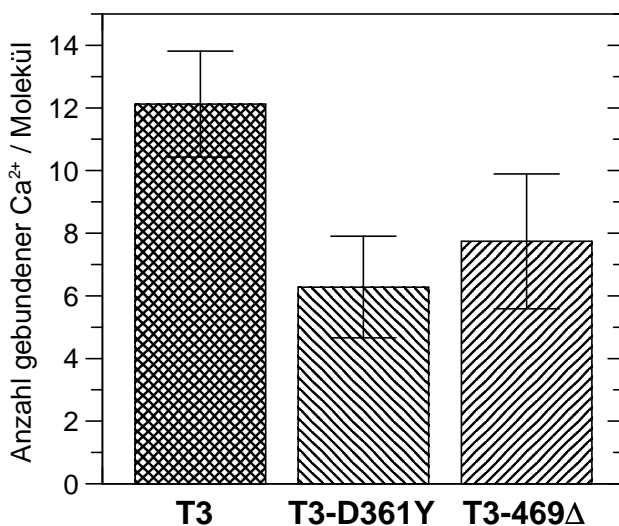


Abb. 31: Gleichgewichtsdialyse zur Bestimmung der Anzahl von Ca^{2+} -Bindungsstellen in der Typ 3 Domäne. Die T3-Konstrukte wurden 16h in TBS mit 1mM Ca^{2+} inkubiert; anschließend wurden aus beiden Kammerhälften je fünf Aliquots entnommen und deren Zerfallsrate je dreimal bestimmt. Das Protein T3 wurde in vier, die T3-Mutanten in je zwei unabhängigen Experimenten untersucht; die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.14 Die Ca^{2+} -Bindungsparameter der Typ 3 Domäne

In Tab. 6 sind die Ergebnisse der spektroskopischen Analysen der Calciumbindung an EGF-T3, T3, D361Y und D469Δ zusammengefasst. Bei der CD-Spektroskopie ging die Elliptizitätsänderung (bezogen auf die Ca^{2+} -gesättigte) Form von 50% bei T3 auf 40% bei den Mutanten zurück; fluorimetrisch wurden andere Werte ermittelt: 490% Signaländerung bei T3 gegenüber 20% bei T3-D361Y und 320% bei T3-D469Δ. Die Analyse der CD-Spektren (Tab. 4) von T3 und T3-Mutanten zeigte keine eindeutigen Unterschiede der an der Konformation beteiligten Sekundärstrukturelemente; D361Y besitzt im Ca^{2+} -gesättigten Zustand eventuell weniger β -Faltblatt-Struktur.

Tab. 6: Parameter der Ca^{2+} -Bindung von Wildtyp und mutierten COMP Fragmenten

	Circular Dichroismus						Dialyse	Fluoreszenz					
Protein	$\Delta[\theta]^a$ (%)	K_{d1}^b (mM)	n_{H1}^b	Signal 1 ^c (%)	K_{d2}^b (mM)	n_{H2}^b	Bindungs- stellen ^f	ΔF^d (%)	K_{d1}^e (mM)	n_{H1}^e	Signal 1 ^c (%)	K_{d2}^e (mM)	n_{H2}^b
EGF-T3	45	0,26 $\pm 0,01$	3,0 $\pm 0,2$	100	-	-	ϕ	570	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
T3	50	0,30 $\pm 0,01$	3,7 $\pm 0,4$	80 ± 5	4,13 $\pm 2,21$	1,2 $\pm 0,4$	12,1 $\pm 1,7$	490	0,24	5,9 $\pm 0,5$	94 ± 4	1,25 $\pm 1,48$	2,0 $\pm 3,5$
T3-D361Y	40	0,25 $\pm 0,01$	4,5 $\pm 0,9$	55 ± 4	2,73 $\pm 0,44$	1,5 $\pm 0,2$	6,3 $\pm 1,6$	20	1,14 $\pm 0,01$	3,6 $\pm 0,1$	100	-	-
T3-D469Δ	40	0,28 $\pm 0,01$	3,7 $\pm 0,5$	70 ± 6	1,45 $\pm 0,29$	2,8 $\pm 1,0$	7,7 $\pm 2,1$	320	0,24	8,0 $\pm 0,8$	80 ± 5	0,69 $\pm 0,23$	1,9 $\pm 0,4$

Alle Werte wurden gerundet. ϕ Das Konstrukt EGF-T3 wurde in den Fluoreszenzuntersuchungen nicht systematisch analysiert. ^a Prozentuale Änderung der Elliptizität bei 215 nm. ^b Die Gleichgewichts-

Dissoziationskonstanten K_d und die Hill Koeffizienten n_H wurden mit einem Modell bestimmt, das zwei verschieden affine, kooperative Klassen von Ca^{2+} -Bindungsstellen berücksichtigt. Die Bindungsparameter wurden durch Anpassung des Modell an die gemessene Elliptizität (215nm) ermittelt; die Analyse der Elliptizität bei 222nm ergab keine signifikant abweichenden Konstanten K_d und n_H . ^c Prozentualer Beitrag des Signals, der auf die hochaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen mit K_{d1} und n_{H1} entfällt. ^d Prozentuale Änderung der Fluoreszenz (Emmission bei 350nm, Anregung bei 280nm).

^e Zur Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d und der Hill Koeffizienten n_H wurde ein Modell an die Messwerte angepasst, das entweder gleichartige (bei T3-D361Y) oder 2 verschieden affine, kooperative Klassen von Ca^{2+} -Bindungsstellen berücksichtigte (bei T3 und T3-D469Δ betrug der Standardfehler von K_{d1} weniger als $\pm 0,005$). Ausgewertet wurde die Emission bei 350nm (Anregung bei 280nm). ^f Die Gleichgewichts-Dialyse wurde in Gegenwart von 1mM Ca^{2+} durchgeführt. Zur Berechnung der Bindungsstellen-Anzahl von T3 wurden 4 Experimente, für T3-D361Y und T3-D469Δ wurden jeweils 2 Versuche ausgewertet; die gebundene Radioaktivität wurde durch Fünffachbestimmung gemessen. Die Standardabweichung ist angegeben.

Die spektroskopisch aus den Ca^{2+} -Titrations bestimmten Daten (Abb. 29 A, B; Abb. 30 D) deuteten auf eine biphasische Ligandenbindung hin und ließen sich durch ein Modell beschreiben, dem zwei verschieden affine und kooperative Klassen von Ca^{2+} -Bindungsstellen zugrunde lagen. Nur die Fluoreszenzdaten von T3-D361Y ließen sich auch unter Berücksichtigung einer einzigen Klasse von Bindungsstellen beschreiben.

Die Auswertung der CD-Daten ergab für T3, daß 80% der Konformationsänderung (ausgedrückt als relative Änderung der Elliptizität) beim Wildtyp durch hochaffine, hochkooperative Ca^{2+} -Bindung ($K_{d1} = 0,30\text{mM}$ und $n_{H1} = 3,7$) verursacht wurde. Die Affinität von den hochaffinen Bindungsstellen der T3-Mutanten war nicht oder nur gering verändert (T3-D361Y: $K_{d1} = 0,25\text{mM}$, $n_{H1} = 4,5$; T3-D469Δ: $K_{d1} = 0,28\text{mM}$, $n_{H1} = 3,7$), jedoch unterschieden sie sich vom Wildtyp durch den Anteil der Konformations-Änderung, der von der hochaffinen Bindung herrührte: Im Fall von T3-D361Y waren es 50%, bei T3-D469Δ 70%.

Die Fluorimetrie zeigte, daß bei allen T3-Konstrukten die gemessene Fluoreszenz nur auf der Emission des einzelnen Trp (W344) im dritten Typ 3 Motiv beruhte. Die Auswertung der Titrations-Experimente ergab, daß bei T3 die hochkooperative und hochaffine Ca^{2+} -Bindung ($K_{d1} = 0,24\text{mM}$, $n_{H1} = 5,9$) 94% der Fluoreszenzänderung verursacht. Die Signaländerung der Mutante T3-D361 ließ sich durch Ca^{2+} -Bindungsstellen unformer, drastisch gesunkener Affinität beschreiben ($K_d = 1,12\text{mM}$ Ca^{2+} , $n_H = 3,8$). Durch Analyse der biphasischen Ca^{2+} -Titrationskurve von T3-D469Δ konnten 80% der Fluoreszenz-änderung auf die hochaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen dieses COMP-Konstruktes zurückgeführt werden, bei einer verglichen mit T3 unveränderten Affinität ($K_{d1} = 0,24\text{mM}$, $n_{H1} = 8$).

Durch Gleichgewichtsdialyse wurde gezeigt, daß in Gegenwart von 1mM Ca^{2+} die Typ 3 Domäne des Wildtyps $\sim 12,1 \pm 1,7$ Ca^{2+} -Ionen bindet; unter Berücksichtigung der Fehlerstreuung stimmt dieses Ergebnis gut mit den 13 Bindungsstellen überein, die aufgrund der Sequenzähnlichkeit zur Ca^{2+} -Bindungsstelle der EF-Hand vorhergesagt wurden. Offensichtlich führen die Punktmutationen zum Verlust von mehreren Ca^{2+} -Bindungsstellen: T3-D361Y bindet nur noch die Hälfte ($6,3 \pm 1,6$ Ca^{2+}), T3-D469Δ noch etwa zwei Drittel ($7,7 \pm 2,1$ Ca^{2+}) der Anzahl von Ca^{2+} -Ionen des Wildtyps. Wie auch die bei CD- und Fluoreszenzmessungen beobachtete hohe Kooperativität der Ca^{2+} -Bindung legt das nahe, daß sich die Bindungsstellen gegenseitig beeinflussen.

3.15 Die COMP-Kollagen-Wechselwirkungen im Festphasen-System

Ligandenbindungen können in der flüssigen Phase stattfinden (in dieser Arbeit: Elliptizitäts- und Fluoreszenzmessungen der Ca^{2+} -Bindung an COMP), oder in einem gemischtphasigen System (ein gelöster Ligand bindet an einen unlöslichen Bindungspartner; in dieser Arbeit: Untersuchungen zur COMP-Kollagen-Bindung). Obwohl die Funktion von COMP ungeklärt ist, gibt es Hinweise auf eine strukturelle Beteiligung am Aufbau der extrazellulären Matrix (ECM) *in vivo* und Bindung von COMP an

Kollagene. In diesem Fall stellt das ausgedehnte extrazelluläre Kollagennetzwerk eine Festphase dar, und durch seine Bindung würde COMP aus der flüssigen in die feste Phase überführt. Bei der *in vitro*-Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wird oft ein Bindungspartner an einer Festphase immobilisiert (Mikrotiterplatte, Agarosekugeln, Goldfolie bei der SPR-Messung, etc.). Das Verhältnis von gelöstem zu gebundenem Ligand oder die Kinetik der Bindung ermöglichen dann Aussagen über die apparente Affinität der Bindung.

Die Interaktion von COMP mit tripelhelikalen Kollagenen konnte *in vitro* gezeigt werden (Rosenberg *et al.*, 1998); auf eine physiologische Relevanz dieser Wechselwirkung deutet hin, daß Mutationen in COMP (Briggs *et al.*, 1995; Hecht *et al.*, 1995) und in den $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Ketten von Kollagen IX (Muragaki *et al.*, 1996b; Paasilta *et al.*, 1999) die Erbkrankheit MED verursachen können; außerdem wurden COMP und Kollagen IX in den lamellären Ablagerungen im rER von PSACH-Chondrocyten nachgewiesen (Maddox *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Überlegungen sollte der Einfluss der Mutationen auf die Bindung von COMP an Kollagen untersucht werden.

3.15.1 COMP-Kollagen Interaktion in ELISA-artigen Experimenten

Die Untersuchung der COMP-Kollagen-Bindung wurde in ELISA-artigen (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) Experimenten durchgeführt: Kollagen wurde an der Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert, anschließend die verbliebenen Plastikbindungsstellen mit BSA abgesättigt und COMP als gelöster Ligand zugegeben. Gebundenes COMP wurde mit anti-Rinder-COMP-Serum aus Kaninchen (α -COMP pAb) und HRP-konjugiertem anti-Kaninchen IgG (2.pAb/HRP) markiert und durch eine Farbreaktion mit TMB photometrisch bei 450nm (OD₄₅₀) nachgewiesen.

Optimierung der Bedingungen für ELISA-artige Experimente

Vor den geplanten Bindungsstudien wurden die geeigneten experimentellen Bedingungen untersucht. Aus Abbildung 32A ist zu entnehmen, daß rCOMP, mCOMP und D361Y in vergleichbarem Umfang an die Oberfläche der Mikrotiterplatte banden; halbmaximale Sättigung wurde bei 0,08µg/ml für rCOMP und mCOMP und bei 0,1µg/ml für D361Y erreicht. Die Nachweisreaktion des Antigens verlief bei Konzentrationen $\leq 0,13\mu\text{g/ml}$ annähernd linear und ging ab 4µg/ml in die Sättigung (Plateau) über.

Zur Bestimmung der geeigneten Verdünnung des α -COMP pAb wurden Mikrotiterplatten mit 0,1µg/ml D361Y beschichtet. Bis zu einer Verdünnung des Erstantikörpers von 1:800 befand sich die Nachweisreaktion in Sättigung (Abb. 32B); für die folgenden Untersuchungen wurde der α -COMP pAb standardmäßig 1:1600 verdünnt, da in den Bindungsexperimenten auf Kollagen-beschichteten Oberflächen bei höherer Antikörperkonzentration ein überproportional starker Hintergrund auftrat. Der HRP-konjugierte Zweitantikörper wurde in den weiteren Experimenten 1:2000 verdünnt; dies war für die Bindungsstudien der optimale Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und dem Verhältnis von Signal : Hintergrund. Die Mikrotiterplatten wurden für die Bindungsstudien mit 2 µg/ml Kollagen (in 1% = 0,18 M Essigsäure)

beschichtet; in Parallelexperimenten durchgeführte Beschichtungen mit Kollagen-Konzentrationen bis 50 µg/ml führten zu keiner signifikanten Steigerung der gemessenen Extinktionen (Daten nicht gezeigt).

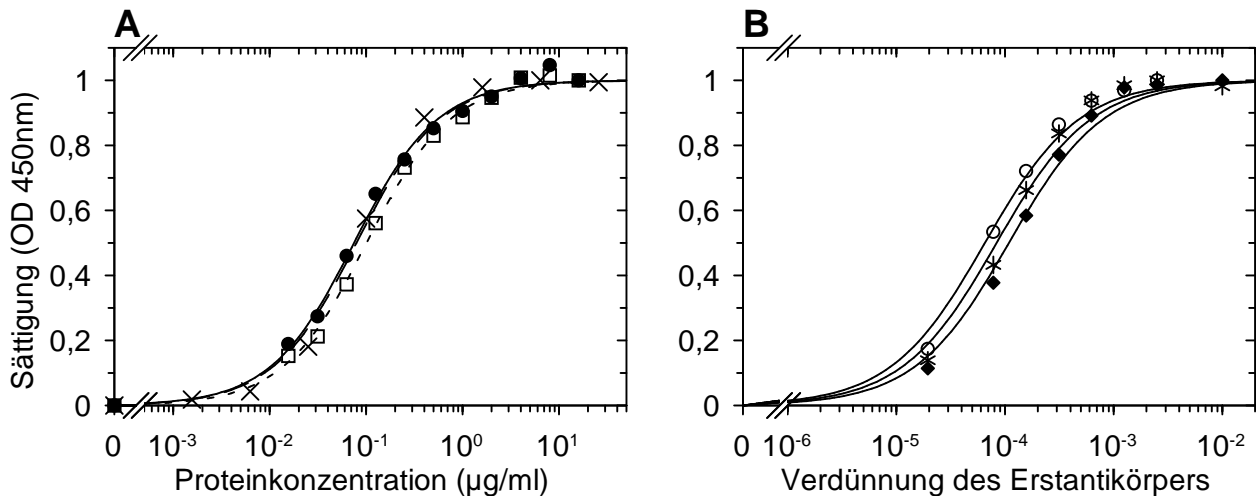


Abb. 32: Titration von Antigen und Antikörper zur Bestimmung der geeigneten Antikörperverdünnung. Die Detektion erfolgte mit α -COMP pAb und 2. Ab/HRP durch Reaktion mit H₂O₂/TMB, die gemittelte OD₄₅₀ der Vierfachbestimmung wurde in Sättigung umgerechnet (Sättigung = OD₄₅₀ des Messpunktes / OD₄₅₀ des Maximums).

(A) Analyse der Beschichtungseffizienz und der Reaktivität des α -COMP pAb mit rekombinantem COMP; Mikrotiterplatten wurden mit 0-16 µg/ml rCOMP (gefüllte Kreise, durchgezogene Linie), D361Y (offene Quadrate, gestrichelte Linie) und 0-25,6 µg/ml mCOMP (Kreuze, unterbrochene Linie) in TBS beschichtet, gewaschen und mit 1% BSA blockiert. rCOMP und D361Y wurden gemeinsam, mCOMP in einem unabhängigen Experiment untersucht.

(B) Zur Bestimmung der geeigneten Antikörperverdünnungen wurden Mikrotiterplatten mit 0,1 µg/ml D361Y in TBS beschichtet und anschließend mit 1% BSA blockiert. Der α -COMP pAb wurde 1:100 bis 1:51200 verdünnt, der 2.Ab/HRP 1:1000 (ausgefüllte Raute), 1:2000 (Stern) oder 1:4000 (offene Kreise).

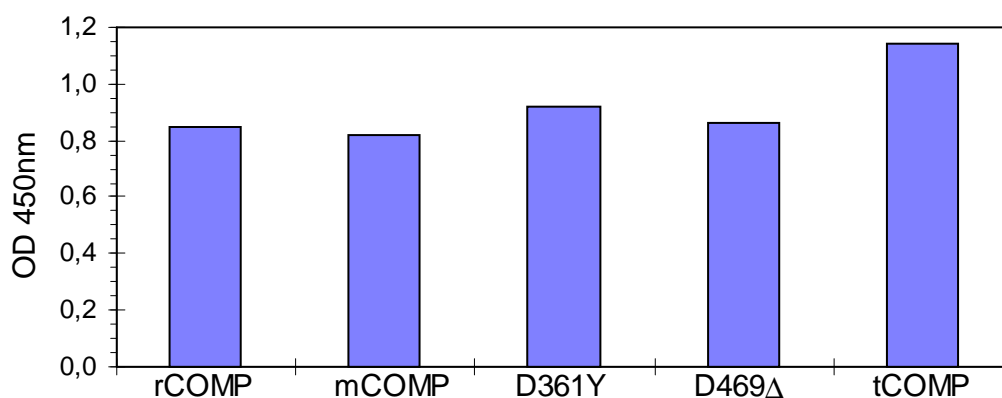


Abb. 33: Reaktivität des α -COMP pAb mit rekombinantem COMP und bovinem tCOMP. Mikrotiterplatten wurden mit 10ng D361Y beschichtet und mit 1% BSA blockiert. Die Detektion erfolgte mit dem α -COMP pAb und 2. Ab/HRP durch Reaktion mit H₂O₂/TMB. Gezeigt sind die arithmetischen Mittelwerte der Vierfachbestimmung.

Der α -COMP pAb wurde durch Immunisation von Kaninchen mit EDTA-extrahiertem tCOMP aus bovinem Knorpel gewonnen (Di Cesare *et al.*, 1994b), den rekombinant exprimierten Konstrukten lag hingegen die Rattensequenz zugrunde. Es sollte daher geklärt werden, ob der Antikörper die rekombinanten Proteine vom Wildtyp und die Mutanten in gleichem Maß erkennt. Im Rahmen der bei ELISA-artigen Experimenten auftretenden Schwankungen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Reaktivität des α -COMP pAb mit den rekombinanten Proteinen (Abb. 32A, Abb. 33), unabhängig vom Oligomerisierungsgrad (rCOMP, mCOMP) und davon, ob es sich um den Wildtyp oder die Mutanten handelte. Deutlich besser wurde tCOMP erkannt (Abb. 33). Konstrukte ohne TC-Domäne zeigten keine Kollagenbindung und wurden vom α -COMP pAb (z.B. im Immunoblot) deutlich schwächer erkannt (Daten nicht gezeigt).

Bestimmung der apparenten Bindungskonstante K_{app}

Zur Charakterisierung der Affinität einer Interaktion dient die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d , deren Bestimmung die Kenntnis der freien Ligandenkonzentration oder der Bindungskinetik voraussetzt. In den hier beschriebenen ELISA-artigen Bindungsexperimenten konnte weder die Menge des immobilisierten Kollagens, noch die Anzahl der COMP-Bindungsstellen quantifiziert werden; außerdem wird die Bindung nicht im vollkommen stabilen Gleichgewicht von freiem und gebundenem Liganden analysiert, da durch Waschschrte und Antikörperinkubationen das Verhältnis der beiden Bindungspartner möglicherweise verschoben wird. Daher wird die Affinität im folgenden Abschnitt nicht durch die 'Gleichgewichts-Dissoziationskonstante' (K_d), sondern mit dem Begriff 'apparente Bindungskonstante' (K_{app}) beschrieben; sie entspricht der Konzentration des Liganden bei Inkubation, mit der das halbmaximale Signal detektiert wurde. Alle molaren Konzentrationsangaben beziehen sich auf die pentameren Proteine!

Zur Bestimmung der apparenten Bindungskonstante K_{app} wurden Mikrotiterplatten mit Kollagen I (Pepsin-extrahiert aus Rinderhaut) oder rekombinantem humanem Kollagen IX (Pihlajamaa *et al.*, 1999) beschichtet und in Gegenwart von $0,5\text{mM Zn}^{2+}$ mit $0\text{--}20\text{nM COMP}$ ($= 0\text{--}8\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Blockierung, Detektion und photometrische Messung erfolgte wie beschrieben. Ein Langmuir-Modell wurde an die Messwerte angepasst; dabei wurde eine equimolare Stöchiometrie angenommen

Die Messwerte und die Kurvenanpassungen der Titration von Kollagen I bzw. IX mit tCOMP, rCOMP, D361Y und D469 Δ (Abb. 34) zeigten konzentrationsabhängige Sättigungskurven. Die Bindungskurven und die K_{app} -Werte der Kollagen I-Bindung (Abb. 34, Linie; vgl. auch Kapitel 3.15.3: Tab. 7) ähnelten sich sehr: $K_{app}=0,6\text{nM}$ bei rCOMP und tCOMP; $K_{app}= 0,4\text{nM}$ bei D361Y und bei D469 Δ .

Dagegen ergab die COMP-Kollagen IX-Interaktion (Abb. 34, unterbrochene Linie) ein heterogeneres Bild: D361Y und D469 Δ banden mit der höchsten Affinität ($K_{app}= 0,9$), wobei D469 Δ den höchsten Standardfehler der Kurvenanpassung aufwies ($\pm 0,5\text{nM}$; alle übrigen K_{app} -Werte: weniger als $\pm 0,1\text{nM}$). Eine mittlere Affinität zu Kollagen IX zeigte rCOMP mit $K_{app}= 1,5\text{nM}$; für die Interaktion von tCOMP mit Kollagen IX wurde mit $K_{app}= 3,5\text{nM}$ die höchste apparente Bindungskonstante ermittelt. Mit Ausnahme der Bindung von tCOMP an humanes Kollagen IX lagen also alle ermittelten K_{app} -Werte um 1nM COMP ($\sim 0,4\mu\text{g/ml}$).

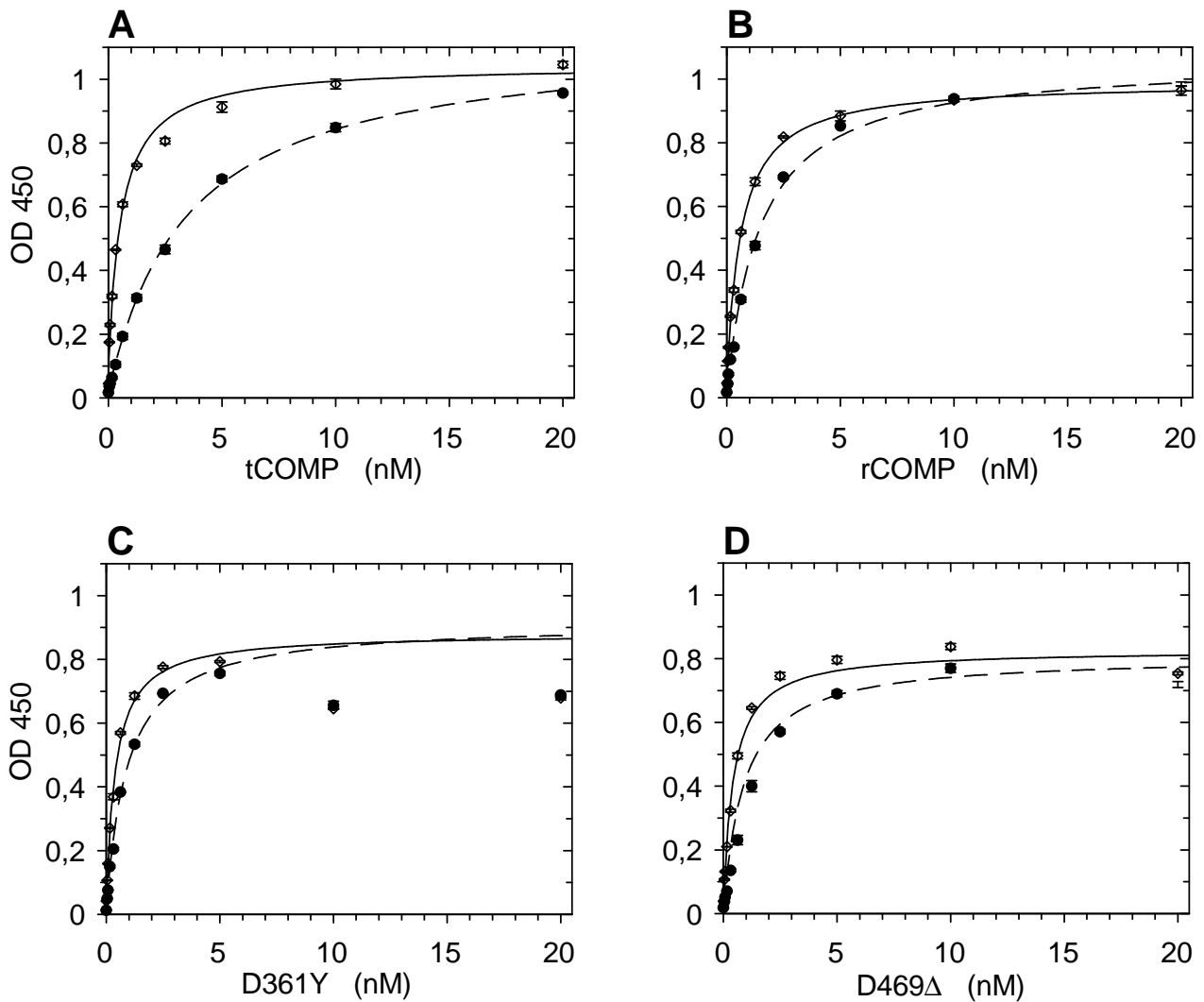


Abb. 34: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von COMP an Kollagen. Mikrotiterplatten wurden mit pepsinextrahiertem Kollagen I (offene Raute) oder rekombinantem humanen Kollagen IX (gefüllte Kreise) beschichtet ($2\mu\text{g/ml}$) und mit 0-20nM ($\sim 0\text{-}8\mu\text{g/ml}$) COMP in TBS mit $0,5\text{mM Zn}^{2+}$ inkubiert. Die Detektion erfolgte mit $\alpha\text{-COMP pAb}$ und 2. Ab/HRP durch Reaktion mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TMB}$. Die Affinität wurde mit einem Langmuir-Bindungsmodell berechnet, das eine equimolare COMP-Kollagen-Interaktion berücksichtigt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Vierfachbestimmung; die Standardabweichung ist als Fehlerbalken eingezeichnet.

Die Zink-Abhängigkeit der Bindung von COMP an Kollagen

Die PSACH/MED-assoziierten COMP-Mutationen wurden nahezu ausschließlich in der Typ 3 Domäne gefunden; in der vorliegenden Arbeit wurde CD- und Fluoreszenz-spektroskopisch gezeigt, daß die Typ 3 Domäne unter Konformationsänderung Ca^{2+} bindet, sowie, daß die untersuchten Mutanten eine eingeschränkte Konformationsänderung und einen teilweisen Verlust von hochaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen zeigen. Die Anwesenheit von Zn^{2+} führte zu keiner CD- oder Fluoreszenz-spektroskopisch messbaren Veränderung. In einer anderen Arbeit wurde die Abhängigkeit der COMP-Kollagen-Bindung von divalenten Kationen gezeigt: Zn^{2+} und Ni^{2+} , nicht aber Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Mn^{2+} fördern die Kollagen-Bindung (Rosenberg *et al.*, 1998). Damit stellte sich die Frage, ob die Zn^{2+} -abhängige COMP-Kollagen-Interaktion durch Ca^{2+} beeinflusst wird und ob die Mutanten eine veränderte Zn^{2+} -Abhängigkeit der Bindung zeigen.

Die Bindung von Wildtyp und mutiertem COMP an Kollagen-beschichtete Oberflächen wurde bei unterschiedlichen Zn^{2+} -Konzentrationen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} untersucht; die jeweiligen Zn^{2+} - und Ca^{2+} -Konzentrationen wurden beim Waschen und bei den Antikörperinkubationen konstant gehalten.

Ohne Zn^{2+} oder in Gegenwart von Ca^{2+} band COMP nicht signifikant an Kollagen I (Abb. 35-38). Bei $10\mu\text{M}$ Zn^{2+} zeigten nur die Wildtyp-Proteine tCOMP und rCOMP eine schwache Bindung (Abb. 35, hellgraue Balken). Bei $100\mu\text{M}$ Zn^{2+} (Abb. 35, dunkelgraue Balken) banden alle untersuchten Proteine an Kollagen I, und in Anwesenheit von 1mM Zink (Abb. 35, schwarze Balken) erhöhte sich die Menge des gebundenen COMP nochmals erheblich. In diesem Experiment banden die Mutanten bei $10\mu\text{M}$ Zn^{2+} also nicht und Wildtyp COMP nur schwach an Kollagen I.

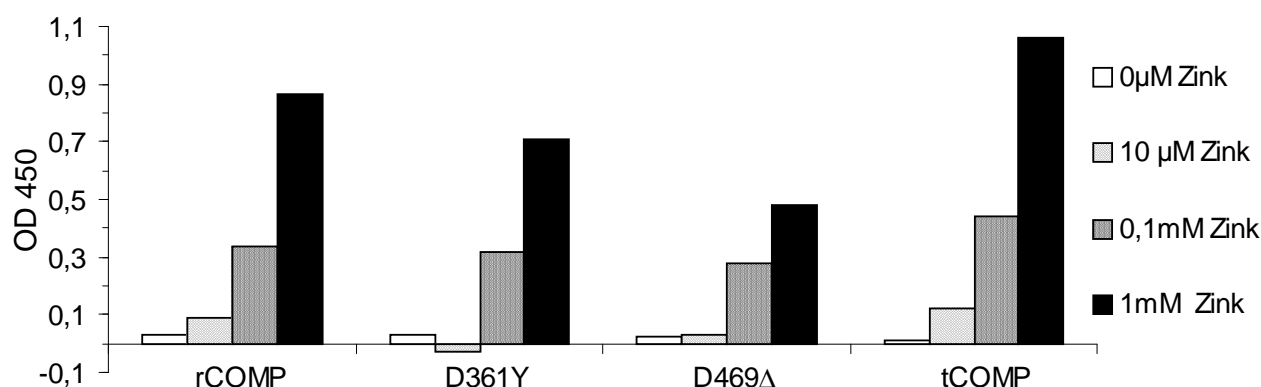


Abb. 35: Zinkabhängige Bindung von COMP an Kollagen I. Die Oberfläche von Mikrotiterplatten wurde mit $2\mu\text{g/ml}$ Kollagen I beschichtet. Nach Inkubation mit 10nM ($\sim 4\mu\text{g/ml}$) COMP in TBS mit $0 / 0,01 / 0,1 / 1\text{mM}$ Zn^{2+} wurde gebundenes COMP mit $\alpha\text{-COMP pAb}$ und $2.\text{Ab/HRP}$ durch Reaktion mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TMB}$ detektiert. Die gezeigten Werte sind das arithmetische Mittel von vier Messwerten.

Die Zinkabhängigkeit der Bindung von rCOMP D361Y und D469Δ an Kollagen I, II und IX wurde in einer feiner abgestuften Zinktitration untersucht. Wie in Abbildung 36A gezeigt ist, ließ sich die gemessene COMP-Kollagen I -Bindung als eine Funktion der Zn^{2+} -Konzentration durch eine Bindungskurve beschreiben, die bei $0,5\text{mM}$ Zn^{2+} in Sättigung überging. Für die halbmaximale Sättigung der Kollagen I-Bindung benötigten die Mutanten signifikant mehr Zn^{2+} als der Wildtyp (vgl. Kapitel 3.15.3, Tab. 7):

$$[\text{Zn}^{2+}]_{0,5} = 10\mu\text{M} \text{ } \text{Zn}^{2+} \text{ für rCOMP; } [\text{Zn}^{2+}]_{0,5} = 20\mu\text{M} \text{ für D361Y und } [\text{Zn}^{2+}]_{0,5} = 40\mu\text{M} \text{ für D469}\Delta.$$

Demgegenüber wurde bei der Bindung an Kollagen II und IX keine Sättigung erreicht (Abb. 36B,C), und es ließ sich kein $[\text{Zn}^{2+}]_{0,5}$ -Wert bestimmen. Die Messwerte zeigten jedoch in Übereinstimmung mit anderen Experimenten, daß bei Bindung von rCOMP an Kollagen I, II und IX eine höhere OD_{450} erzielt wurde als bei den mutierten Pentameren, wobei D469Δ generell die niedrigsten Werte ergab. Die verglichen mit rCOMP zu einer höheren Zn^{2+} -Konzentration verschobenen Bindungskurven von D361Y und D469Δ (Abb. 36B, C) deuten also auch auf eine niedrigere Zn^{2+} -Affinität der Bindung von mutiertem COMP an Kollagen II und IX hin.

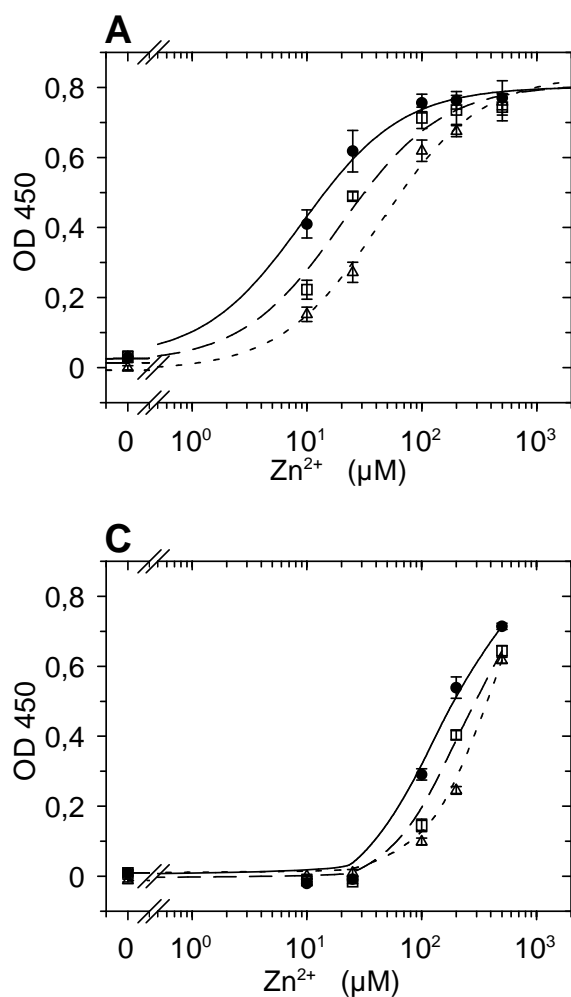


Abb. 36: Zn^{2+} -Abhängigkeit der Interaktion von COMP und Kollagen. Mikrotiterplatten wurden mit $2\mu\text{g/ml}$ Kollagen I (A), Kollagen II (B) oder Kollagen IX (C) beschichtet und mit 5nM rCOMP (gefüllte Kreise, durchgezogene Linie), D361Y (offene Quadrate, unterbrochene Linie) und D469 Δ (offene Dreiecke, gestrichelte Linie) in TBS mit $0 / 0,01 / 0,025 / 0,1 / 0,2 / 0,5$ mM Zn^{2+} inkubiert. Gebundenes COMP wurde mit α -COMP pAb und 2. Ab/HRP durch Reaktion mit H_2O_2 /TMB detektiert. Sättigung der Bindung wurde nur in 1mM Zn^{2+} an Kollagen I erreicht (A). Fehlerbalken: Durchschnittliche absolute Abweichung vom Mittelwert; Vierfachbestimmung.

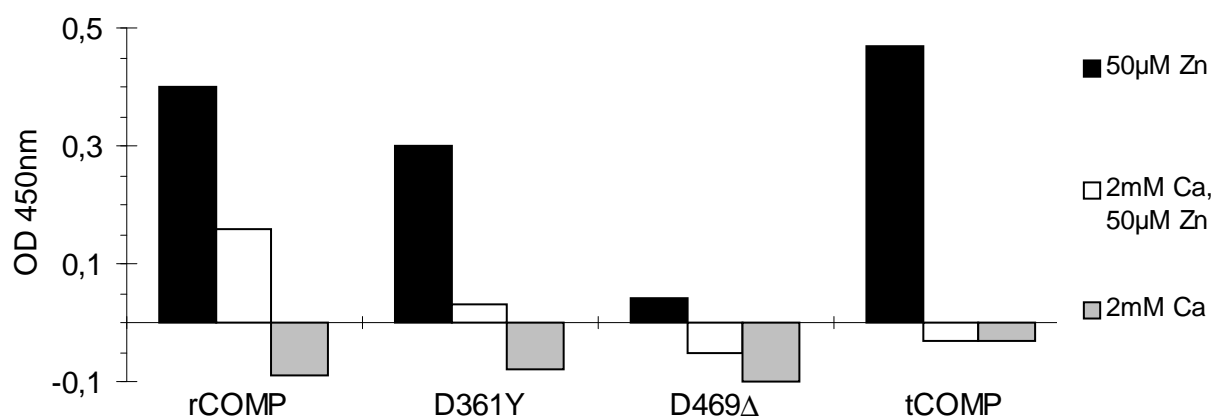


Abb. 37: Inhibition der Zink-abhängigen Bindung von COMP an Kollagen I durch Calcium. Mikrotiterplatten wurden mit $2\mu\text{g/ml}$ Kollagen I beschichtet und mit $2,5\text{nM}$ COMP in Gegenwart von Zn^{2+} , Ca^{2+} oder Zn^{2+} mit Ca^{2+} inkubiert. Gebundenes COMP wurde mit α -COMP pAb und 2. Ab/HRP durch Reaktion mit H_2O_2 /TMB detektiert. Die gezeigten Werte sind das Arithmetische Mittel von 4 Messwerten

Eine weitere Beobachtung aus einer Vielzahl von ELISA-artigen Bindungsexperimenten war die Zunahme des Hintergrunds in Anwesenheit von Ca^{2+} oder bei Zinkkonzentrationen unter $50\mu\text{M}$. Kontroll-Experimente zeigten keine unspezifische Bindung der Antikörper (Daten nicht gezeigt). Vielmehr band bei niedrigen Zn^{2+} -Konzentrationen teilweise mehr rekombinantes COMP an BSA-beschichtete Kontrolloberflächen als an Kollagen-beschichtete. Zumindest im Fall der Anwesenheit von Ca^{2+} könnte die beobachtete Neigung zur Aggregation eine Rolle spielen. Ungeachtet der physiologischen Relevanz dieser Beobachtung, war die Zunahme des Hintergrunds bei den Mutanten besonders ausgeprägt.

In Abbildung 37 ist das Ergebnis eines Experiments dargestellt, bei dem Kollagen I-beschichtete Mikrotiterplatten mit COMP in Gegenwart von Ca^{2+} oder Zn^{2+} , oder Ca^{2+} und Zn^{2+} inkubiert wurden. In 2mM Ca^{2+} (Abb. 37, graue Balken) war keine, in Gegenwart von $50\mu\text{M}$ Zn^{2+} (Abb. 37, schwarze Balken) starke Bindung von rCOMP, D361Y und tCOMP an Kollagen I detektierbar; die Mutante D469 Δ zeigte in $50\mu\text{M}$ Zn^{2+} eine sehr geringe Bindung. Bei hohem Ca^{2+} -Überschuss band in Gegenwart von Zink ($50\mu\text{M}$ Zn^{2+} , 2mM Ca^{2+}) nur rCOMP an Kollagen I (Abb. 37, weiße Balken). Möglicherweise sind Aggregationsvorgänge an der niedrigen Kollagenbindung ursächlich mitbeteiligt.

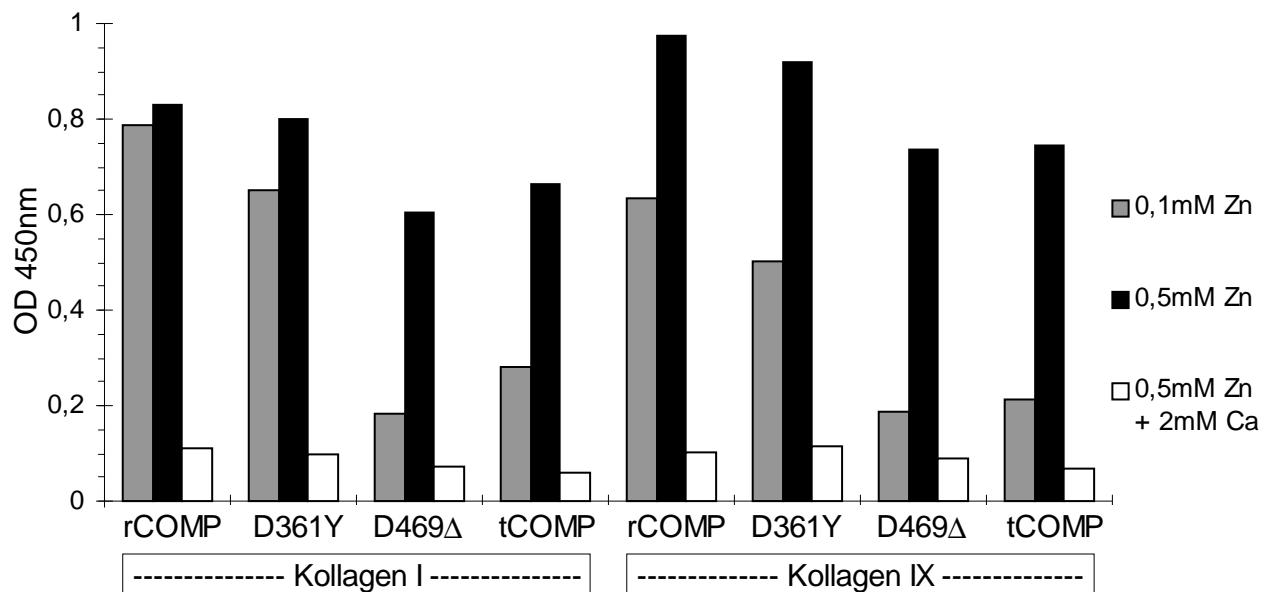


Abb. 38: Inhibition der Zink-abhängigen Bindung von COMP an Kollagen I durch Calcium. Mikrotiterplatten wurden mit $2\mu\text{g/ml}$ Kollagen I oder Kollagen IX beschichtet und in Gegenwart von Zn^{2+} oder Ca^{2+} und Zn^{2+} mit $2,5\text{nM}$ COMP inkubiert. Gebundenes COMP wurde mit $\alpha\text{-COMP pAb}$ und 2. Ab/HRP durch Reaktion mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TMB}$ detektiert. Die gezeigten Werte sind das Arithmetische Mittel von 4 Messwerten

In einem weiteren Experiment wurde - analog zum vorher geschilderten Versuch - die Bindung von COMP an Kollagen I und IX in Gegenwart von Zn^{2+} , mit und ohne Ca^{2+} untersucht. Wie in Abbildung 38 gezeigt ist, band in 2mM Ca^{2+} mit 0,5mM Zn^{2+} kaum COMP (Abb. 38, weiße Balken); sowohl bezogen auf die Kollagene, als auch in Bezug auf die COMP-Konstrukte ließen sich im Bindungsverhalten keine eindeutigen Unterschiede erkennen.

In Anwesenheit von 0,1mM und 0,5mM Zn^{2+} war dagegen eine deutliche Bindung aller Konstrukte an beide Kollagene zu verzeichnen (Abb. 38, graue und schwarze Balken). Interessanterweise waren in 0,1mM Zink die Signalunterschiede der verschiedenen Liganden relativ zueinander größer als in 0,5mM Zink; dies weist darauf hin, daß die Interaktion bei 0,5mM Zn^{2+} in der Nähe der Zn^{2+} -Sättigung der Bindung stattfand (vgl. Abb. 36A, C), wogegen sich in Gegenwart von 0,1mM Zn^{2+} die unterschiedliche Zn^{2+} -Affinität von Wildtyp und mutiertem COMP bemerkbar machte.

Vergleicht man die absolute OD_{450} , fällt auf, daß in 0,1mM Zn^{2+} mehr COMP von Kollagen I, in 0,5mM Zn^{2+} mehr COMP von Kollagen IX gebunden wurde; dabei war die Reihenfolge der detektierten Signalintensitäten (OD_{450}) dieselbe: $\text{rCOMP} \geq \text{D361Y} > \text{tCOMP} \geq \text{D469}\Delta$.

Deutlichere Unterschiede zwischen den verschiedenen Inkubationsbedingungen zeigte die Bindung an Kollagen IX (Abb. 38, rechts), abermals ein Hinweis darauf, daß die Interaktion COMP-Kollagen IX erst bei höheren Zinkkonzentrationen als im Fall von Kollagen I in die Sättigung gerät.

3.15.2 Elektronenmikroskopische Visualisierung der COMP-Kollagen-Interaktion

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie als zweiter, unabhängiger Methode wurde die in den Festphasen-Bindungsexperimenten beobachtete Interaktion von COMP mit Kollagen untersucht. Hierzu wurden rCOMP und Kollagen bei RT inkubiert, mit Glycerin gemischt und auf Glimmer gesprüht. Die Proben wurden durch *rotary shadowing* mit Kohlenstoff und Platin besprüht und im Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht und photographiert.

In Abbildung 39 sind Photographien (Ausschnitte) dargestellt, die in Gegenwart von 0,5mM ZnCl_2 die Interaktion von rCOMP mit Kollagen IX zeigen. rCOMP zeigte das bereits erwähnte 'Blumenstrauß-artige' Erscheinungsbild einer pentameren Struktur (vgl. Aufnahmen in Abb. 20) mit 5 peripheren, runden Strukturen, die die globulären TC-Domänen repräsentieren. Das rekombinante Kollagen IX besaß 'Knicke' bei etwa 2/3 der Moleküllänge (NC3-Domäne), wie sie auch bei Gewebe-extrahiertem Kollagen IX gezeigt wurden (Vaughan *et al.*, 1988) und eine rundlich-globuläres Ende (Abb. 39, Pfeilspitzen), was der 4. nicht-kollagenen Domäne (NC4) entsprechen dürfte. Die statistische Auswertung von insgesamt 300 Kollagen IX-COMP-Partikeln zeigte, daß COMP über seine globuläre TC-Domäne (Abb. 39, Pfeile) bevorzugt an die nicht-kollagenen Domänen NC1, NC3 und NC4 von Kollagen IX bindet, und an eine weitere interne Stelle, die der NC2-Domäne entsprechen könnte.

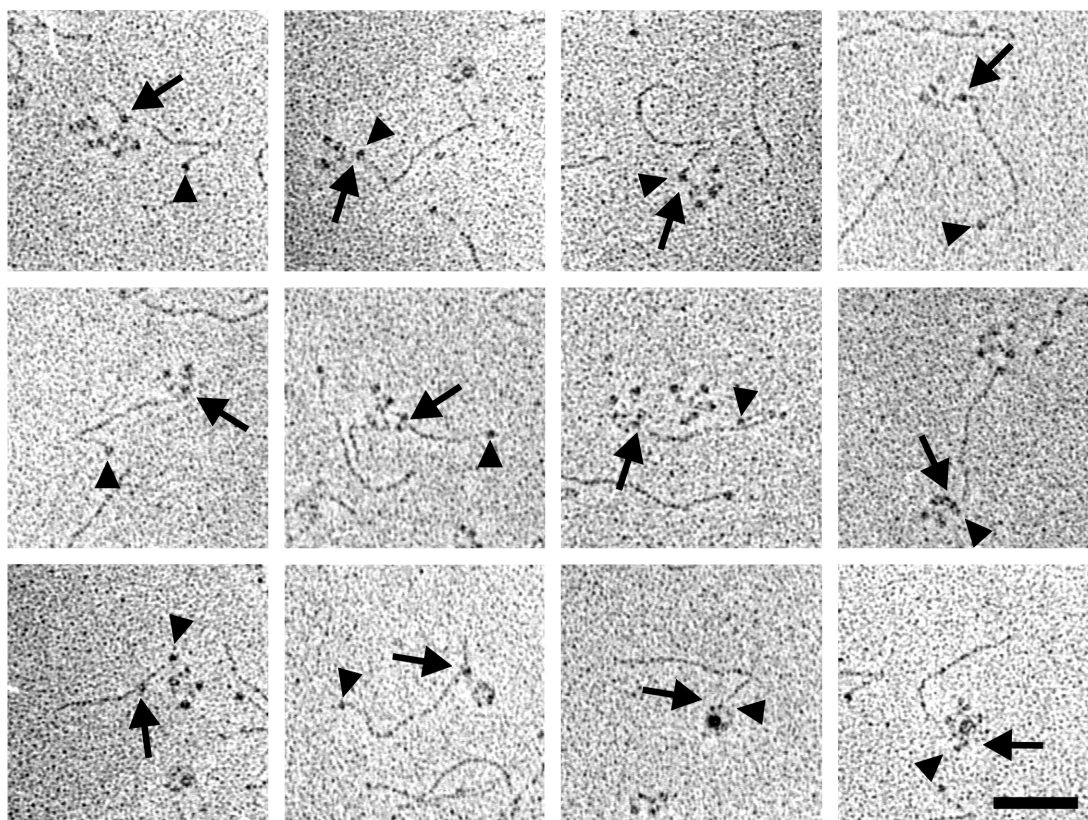


Abb. 39: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Bindung von rCOMP an Kollagen IX. rCOMP und rekombinantes Kollagen IX wurden in equimolarem Verhältnis und in Gegenwart von 0,5mM Zink in 0,2M Ammoniumformiat inkubiert. Die Reaktion wurde mit 80% Glycerol ad 40% verdünnt und sofort auf Glimmer gesprüht. Nach *rotary shadowing* mit Kohlenstoff und Platin wurde die Interaktion am Transmissions-Elektronenmikroskop photographiert. Die Pfeile kennzeichnen die Bindung von rCOMP durch sein globuläres Ende an Kollagen IX. Die Pfeilspitzen deuten auf die aminoterminal gelegene NC4-Domäne von Kollagen IX, die globuläre Strukturen ausbildet. Der Balken entspricht 100nm.

3.15.3 Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mit dem BiaCore System

Die Messungen der Oberflächenplasmonresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) wurden von Frau Krisztina Rosenberg (Lund, Schweden) auf einem BIAcore 2000 System durchgeführt. Die Kollagene wurden kovalent auf der Oberfläche von CM5-Chips immobilisiert und COMP als gelöster Ligand über diese Fläche gepumpt; durch die Interaktion von gebundenem Kollagen mit gelöstem COMP änderte sich der Brechungsindex in der Nähe der Chipoberfläche, was in dimensionslosen '*response units*' als sogenanntes 'Sensogramm' in Echtzeit aufgezeichnet wurde. In Abbildung 40 ist ein solches Sensogramm der Interaktion von rCOMP, D361Y und D469Δ mit Kollagen IX dargestellt. Mit Hilfe der Anpassung eines Langmuir-Bindungsmodells an die Meßwerte wurde die Assoziations- und die Dissoziationsrate bestimmt und daraus die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_d berechnet (Tab. 7).

Die Bindungskinetik zeigte einen biphasischen Verlauf mit sehr langsamer Dissoziationsphase. Die Messwerte ließen sich mitunter nicht zufriedenstellend mit einem Langmuir-Modell beschreiben bzw. auswerten. Trotz der Schwierigkeiten, die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten zu bestimmen, bewiesen die SPR-Messungen qualitativ, daß eine reversible Bindung zwischen COMP und den untersuchten Kollagenen I, II und IX stattfand.

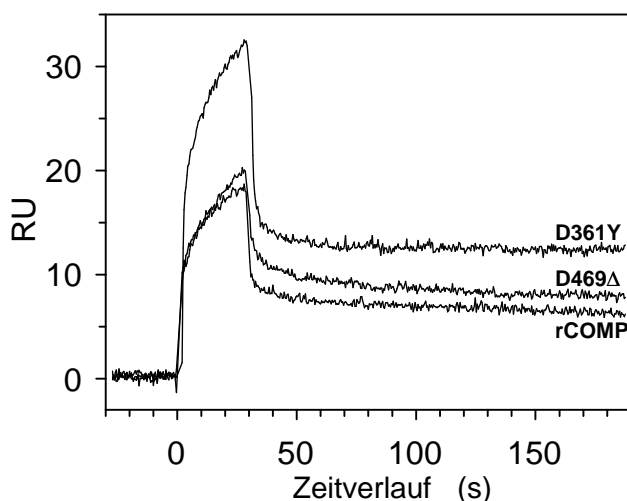


Abb. 40: Surface Plasmon Resonance Messungen der Bindung von COMP an Kollagen IX. 40µl einer 80nM Lösung von rCOMP, D361Y und D469Δ in 25mM HEPES, 150mM NaCl, 0,5mM Zn²⁺, pH 7,4 wurden mit 80µl/min über einen CM5-Sensorchip gepumpt, der mit rekombinatem, humanem Kollagen IX beschichtet worden war. Die Bindungskinetik wurde mit der 'BIAevaluation software 3.0' ausgewertet (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Apparente Bindungskonstanten der COMP-Kollagen-Interaktion

	ELISA-artige Bindungsstudien			Oberflächenplasmonresonanz-Messungen ³					
	Kollagen I ¹ K _{app} (nM)	Kollagen IX ¹ K _{app} (nM)	Kollagen I ² [Zn ²⁺] _{0,5} (µM)	Kollagen I K _d (nM)		Kollagen II K _d (nM)		Kollagen IX K _d (nM)	
				local fit	global fit	local fit	global fit	local fit	global fit
tCOMP	0,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
rCOMP	0,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	10	40±28	0,7	40±7	0,5		1,1
D361Y	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	20	0,5±0,2	0,8	150±133	2,2		0,4
D469Δ	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,5	40	0,7±0,4	2,0	1,7±0,1	1,6	19±4	0,7

¹ Die apparente Bindungskonstante K_{app} entspricht der COMP-Konzentration bei halbmaximaler Sättigung in Gegenwart von 0,5mM Zn²⁺ (vgl. Abb. 34).

² Die Zinkkonzentration bei halbmaximaler Sättigung [Zn²⁺]_{0,5} wurde mit 5nM der rekombinanten Pentamere untersucht und erreichte bei Kollagen II und IX nicht die Sättigung (vgl. Abb. 36).

³ Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten wurden durch SPR-Messungen der Interaktion von COMP mit rekombinatem Kollagen IX, pepsinextrahiertem Kollagen I und II in Gegenwart von 0,5mM Zn²⁺ ermittelt.

4. Diskussion

COMP ist ein aus verschiedenen Domänen modular aufgebautes Protein, dessen Struktur und Funktion bisher nicht genau bekannt ist. Durch Röntgenstrukturanalyse wurde die Struktur der Pentamerisierungsdomäne aufgeklärt (Malashkevich *et al.*, 1996) und die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen von EGF-Domänen aus Faktor XI und Fibrillin (Baron *et al.*, 1992; Downing *et al.*, 1996) lassen sich aufgrund der Homologie mit großer Wahrscheinlichkeit auf die EGF-Domänen von COMP übertragen. Die genauen Strukturen und Domänengrenzen der Typ 3 Domäne und der carboxyterminalen TC-Domäne sind hingegen noch unbekannt; sie wurden bisher nur elektronenmikroskopisch charakterisiert. Aufgrund dieses Mangels an strukturellen und funktionellen Daten sind die Auswirkungen der PSACH/MED-assoziierten COMP-Mutationen und die molekulare Pathogenese dieser Erkrankungen noch ungeklärt.

Um die Konsequenzen der COMP-Mutationen auf die Struktur und Funktion des Proteins zu untersuchen, wurde die Typ 3 Domäne alleine, in Verbindung mit der vierten EGF-Domäne und im Kontext des Volllänge-Proteins rekombinant in 293-Nierenzellen exprimiert; die Mutationen D361Y und D469Δ wurden als Typ 3 Domäne alleine und als Volllänge-Protein exprimiert. Die monomeren Proteine mCOMP, EGF-T3 und T3 ließen sich nicht kristallisieren (E. Hohenester, unveröffentlichte Beobachtungen), was eine Röntgenstrukturanalyse verhinderte. Die Kernresonanz- (NMR-) Spektroskopie von T3 (nicht Isotopenmarkiert) ergab, daß es als Monomer vorliegt und bei Zugabe von Ca^{2+} seine Konformation ändert; aufgrund seiner Größe ließen sich die NMR-Spektren nicht weiter auswerten (K. Downing, unveröffentlichte Beobachtungen). Die gereinigten Proteine wurden durch CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie analysiert und ihre Bindung an Kollagene und Calcium untersucht.

4.1 Rekombinantes COMP entspricht strukturell und funktionell dem Gewebe-extrahierten COMP

Alle Proteine wurden von den transfizierten 293-Nierenzellen in das Kulturmedium sezerniert (Abb.11, 17). Gemessen an der Intensität der Coomassie-gefärbten Banden nach SDS-PAGE ließen sich zwischen Wildtyp und Mutanten keine Unterschiede hinsichtlich der COMP-Konzentration im Kulturüberstand beobachten. Alle Volllängekonstrukte wurden glycosyliert (Abb. 19) und bildeten Pentamere (Abb. 17). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Mutationen in den Typ 3 Motiven nicht *per se* mit der korrekten Faltung, Struktur und Sekretion von COMP interferieren. Die Sekretion der T3-Konstrukte, ihre Ca^{2+} -induzierte Konformationsänderung und die hohe Kooperativität der Ca^{2+} -Bindung (s.u.) weisen darauf hin, daß die Typ 3 Motive eine eigenständige, unabhängige Faltungseinheit bilden: Die **Typ 3 Domäne**.

Die aminoterminalen Protein-Sequenzierung bestätigte die erwartete Abspaltung des Signalpeptids und die elektronenmikroskopische Visualisierung der Pentamere nach *rotary shadowing* (Abb. 20) zeigte das 'Blumenstrauß-artige' Erscheinungsbild wie es von Gewebe-extrahiertem COMP beschrieben wurde (Mörgelin *et al.*, 1992). Die elektronenmikroskopische Gestalt von COMP ändert sich also weder durch die

rekombinante Expression in der Nieren-Zelllinie anstatt in Knorpelzellen, noch durch die Einführung der PSACH/MED-assoziierten Mutationen.

COMP bildet intramolekulare Disulfidbrücken aus, die sich in einem unterschiedlichen Laufverhalten in der SDS-PAGE vor und nach Reduktion äußern; dieses Verhalten wurde insbesondere auch bei der rekombinanten Typ 3 Domäne beobachtet (Abb. 17, Tab. 2). COMP enthält 45 Cysteine und aufgrund der ungeraden Anzahl muss im reifen Protein - auch im Pentamer - mindestens eine freie Sulfhydrylfunktion vorhanden sein. Die beiden Cys in der Oligomerisierungsdomäne bilden im Pentamer einen Ring intermolekularer Disulfide (Malashkevich *et al.*, 1996) und die Anordnung der 24 Cys in den vier EGF-Domänen lässt sich durch Homologievergleiche vorhersagen; somit befindet sich in der Typ 3 Domäne (17 Cys) oder in der TC-Domäne (2 Cys) mindestens ein freies Cystein. Abgesehen von der Pentamerisierung bei den Vollängekonstrukten ließ sich jedoch keine signifikante Bildung von Multimeren beobachten; die freien Sulfhydrylgruppen sind also sterisch nicht zugänglich oder chemisch blockiert.

Die Übereinstimmung der CD-Spektren von rekombinantem und von Gewebe-extrahiertem Wildtyp COMP (rCOMP bzw. tCOMP, vgl. Abb. 24) bedeutet eine gleichartige Beteiligung von Sekundärstrukturelementen am Aufbau: Die Proteine sind strukturell equivalent. In den Festphasen-Bindungsexperimenten erfolgte die Bindung des rekombinanten rCOMP und des bovinen tCOMP mit vergleichbarer Affinität an Kollagen; das rekombinante Protein gleicht also auch in funktioneller Hinsicht dem aus Gewebe extrahierten COMP.

Bei der rekombinanten Expression aller COMP-Vollängekonstrukte fand sich im Zellkulturüberstand immer ein Gemisch von COMP unterschiedlichen Oligomerisierungsgrades (Abb. 12). *In vitro* pentamerisieren isolierte Oligomerisierungs-Domänen spontan und werden durch einen Ring aus intermolekularen Disulfid-Brücken stabilisiert (Efimov *et al.*, 1994; Malashkevich *et al.*, 1996). *In vivo* wurde beim eng verwandten Thrombospondin 1 die cotranslationale Oligomerisierung im rER nachgewiesen, noch bevor die weiter carboxyterminal gelegenen Domänen ihre endgültige Struktur erlangen (Kuznetsov *et al.*, 1997; Prabakaran *et al.*, 1996); eine unvollständige Pentamerisierung als Ursache der Entstehung von Ψ -Oligomere war also unwahrscheinlich. Durch aminoterminal Proteinsequenzierung (vgl. 3.6) wurden die Pseudo- (Ψ -) Monomere als trunkierte COMP-Untereinheiten identifiziert: Ihnen fehlen (abgesehen vom Signalpeptid) die ersten 60 Aminosäuren, welche die Oligomerisierungs- (CC-) Domäne bilden. Offenbar trennt eine Protease die Peptidbindung P60-A61 (Zählweise von rCOMP) auf, und ein bis vier Ψ -Monomere ($MW_{app} = 80\text{kDa}$) werden freigesetzt, jeweils aus vier EGF-, der Typ 3 und der TC-Domäne bestehend (vgl. Anhang 7.2). Die übrigen, intakten Untereinheiten bleiben weiter über ihre pentamere Oligomerisierungs- (CC5-) Domäne miteinander verknüpft und es entstehen Ψ -Tetra-, Ψ -Tri- und Ψ -Dimere mit 400, 300 und 200kDa, bis hin zu Ψ -Monomeren mit CC5-Domäne, 110kDa, und freien CC5-Domänen, 22kDa (alle Angaben: MW_{app} bei nichtreduzierender SDS-PAGE). Die flankierende Sequenz der Proteaseschnittstelle gibt keinen Hinweis auf das beteiligte Enzym. Chen *et al.* zeigten, daß im Gegensatz zu den weiter carboxyterminal liegenden Bereichen die Verbindungsregion zwischen CC5- und erster

EGF-Domäne auch bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen für Trypsin zugänglich und ungeschützt ist (Chen *et al.*, 2000). Unklar bleibt, ob die proteolytische Abspaltung im rER an der entstehenden, noch monomeren Polypeptidkette erfolgt; bei diesem Szenario müßte die Protease bei oder unmittelbar nach Translation der CC-Domäne aktiv werden, und die freigesetzten CC-Fragmente würden mit intakten COMP-Untereinheiten bei der Pentamerisierung konkurrieren. Wahrscheinlicher ist die Entstehung intakter Pentamere und anschließend die Abspaltung der Ψ -Monomere; dies könnte im ER oder extrazellulär erfolgen.

In vivo werden COMP-Degradationsprodukte verstärkt bei degenerativen Knorpeldefekten beobachtet, allerdings sind die Schnittstellen nicht bekannt. Seit einiger Zeit werden COMP-Fragmente in Blut oder Gelenkflüssigkeit auf ihre Eignung als diagnostischer Marker bei Arthritis und Arthrose geprüft (Forslind *et al.*, 1992; Saxne und Heinegård, 1992).

4.2 COMP aggregiert bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen

Die UV-spektroskopischen Untersuchungen zeigten, daß sowohl rekombinantes, als auch Gewebe-extrahiertes Volllänge-COMP in Gegenwart von mehr als 0,25mM Ca^{2+} und bei Proteinkonzentrationen über 100 $\mu\text{g/ml}$ aggregiert (vgl. 3.10, Abb. 22). Der Umfang der Aggregation variierte mit den experimentellen Bedingungen, ließ sich prinzipiell aber immer beobachten. Die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung der Pentamere (und auch von mCOMP) konnte daher spektroskopisch nicht untersucht werden.

Dies wirft die Frage auf, wie sich die Situation *in vivo* darstellt. Bei der 'klassischen' Isolation aus Chondrosarkom (Mörgelin *et al.*, 1992) oder Gelenkknorpel (Di Cesare *et al.*, 1995; Di Cesare *et al.*, 1994b) wird COMP mit EDTA extrahiert; dies weist auf eine von divalenten Kationen abhängige, reversible Verankerung in der ECM hin. Unter den divalenten Kationen dominiert Calcium, seine freie Konzentration beträgt im Blut 1,1-1,3mM; etwa die gleiche Menge liegt zusätzlich an Proteine gebunden vor. Man nimmt an, daß die interstitielle Flüssigkeit im Gleichgewicht mit dem Blut steht, daher wird allgemein auch für die ECM eine freie Ca^{2+} -Konzentration um 1,2mM zugrundegelegt (Gilanyi *et al.*, 1988). Lokal kann die Ca^{2+} -Konzentration jedoch abweichen: Im Inneren der Blutgerinnsel, die beim Wundverschluss entstehen, wurde zwischen den aggregierten Thrombocyten 0,4mM Ca^{2+} detektiert (Owen *et al.*, 1995); in der Haut wurden Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten entdeckt, und an Orten der Knochenresorption wurden bis zu 26mM Ca^{2+} gemessen (einen Überblick bieten: Brown *et al.*, 1995; Maurer und Hohenester, 1997; Maurer *et al.*, 1996).

Es ist daher unklar, ob die beobachtete Aggregation von physiologischer Relevanz ist: Bei einer freien Ca^{2+} -Konzentration um 1,2mM läge COMP *in vivo* überwiegend aggregiert vor.

4.3 Die Mutationen verändern die Konformation und Ca^{2+} -Bindung

In dieser Arbeit wurden zwei Mutationen in der Typ 3 Domäne von COMP untersucht: Die Mutation D361Y verursacht MED und ist klinisch durch unregelmäßig geformte Epiphysen, schwere Arthrose und leichten Zwergwuchs gekennzeichnet (Loughlin *et al.*, 1998). Die Deletion D469 Δ führt zu schwerer

PSACH, die mit starkem Zwergwuchs, deutlich kürzeren Gliedmaßen, überdehnbaren Bändern, Deformationen an Epi- und Metaphysen und schwere Arthrose einhergeht (Deere *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 1995; Ikegawa *et al.*, 1998; Loughlin *et al.*, 1998). Bei beiden Erkrankungen ist das Längenwachstum der Röhrenknochen reduziert. Die Chondrocyten betroffener Individuen weisen - soweit untersucht - im rER lamelläre Ablagerungen aus COMP, Kollagen IX und Aggrecan auf; demgegenüber zeigen die Zellen der Sehnen und Bänder keine derartig veränderte Ultrastruktur des rER.

Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit war daher besonders im Fall der PSACH/MED-assoziierten Mutationen unsicher, ob sich die COMP-Konstrukte durch Transfektion von Nierenzellen rekombinant exprimieren lassen würden. Die erfolgreiche Sekretion der mutierten Konstrukte *in vitro* durch die 293-EBNA Zellen bestätigt die Beobachtung, daß der Zelltyp darüber entscheidet, ob im rER die spezifischen lamellären Ablagerungen der PSACH/MED-Chondrocyten entstehen, oder ob mutiertes COMP sezerniert wird - wie *in vivo* durch Zellen der Sehnen und Bänder von PSACH/MED-Patienten (vgl. 4.5).

Obwohl die COMP-Mutationen *in vivo* zu einem drastischen Phänotyp führen, unterscheidet sich die Sekundärstruktur bzw. Konformation des pentameren Wildtyps und der pentameren COMP-Mutanten nur in subtiler Weise. Zumindest im Ca^{2+} -freien Zustand rufen die Mutationen keine umfangreiche Änderung der Gesamtstruktur von COMP, sondern lokale Effekte hervor (Abb. 41A). In Gegenwart hoher Ca^{2+} -Konzentrationen nimmt die Elliptizität der Proteine zu (Abb. 41B), dabei treten zwischen Wildtyp und Mutanten deutlichere Unterschiede auf; diese sind zumindest teilweise eine Folge der experimentell schwankenden Aggregation bzw. Trübung. Außerdem führt die Ausfällung der Proteine letztlich zu einer verringerten Konzentration der gelösten Pentamere, was gleichbedeutend mit einer Schwächung der Elliptizität ist.

Die dominierenden Sekundärstruktur-Elemente aller COMP-Konstrukte sind β -Faltblätter und ungeordnete Segmente (Tab. 4). Um die Frage nach den strukturellen Folgen der Mutationen zu beantworten, wurde die rekombinant exprimierte Typ 3 Domäne untersucht.

Die CD-Spektren der mutierten Typ 3 Domänen (T3-D361Y und T3-D469 Δ) sind sich sehr ähnlich, unterscheiden sich aber deutlich vom Spektrum des Wildtyps (T3); dies gilt für den Ca^{2+} -freien und den Ca^{2+} -gesättigten Zustand (Abb. 41 C, D und Abb. 24-25, Kapitel 3.11). In Gegenwart von Ca^{2+} verringert sich bei allen T3-Konstrukten reversibel die Elliptizität, es findet also ein Ca^{2+} -induzierter Konformationswechsel in der Typ 3 Domäne statt. Im Gegensatz dazu übt Zn^{2+} keinen Effekt auf die Typ 3 Domäne aus, der sich durch Veränderungen in der Elliptizität, Fluoreszenz oder UV-Absorption nachweisen läßt.

Die Elliptizitätsänderung der T3-Konstrukte ist sicherlich ein Maß für ihren Konformationswechsel, denn abgesehen von Sekundärstrukturen zeigen nur aromatische Aminosäuren in einigen Fällen einen Circular Dichroismus; da die T3-Konstrukte nur ein Trp bzw. im Fall von T3-D361Y je ein Trp und Tyr beinhalten, ist es sehr unwahrscheinlich, daß diese signifikant zur Elliptizität beitragen.

Der Verlauf der CD-Spektren deutet auf eine signifikante Zunahme von α -Helix- und Abnahme von β -Faltblatt-Sekundärstruktur in Gegenwart von Ca^{2+} hin (Tab. 4). Die Verlässlichkeit der Strukturvorhersage der Typ 3 Domäne wird allerdings durch ihren stark sauren Charakter, ihre elektronenmikroskopisch länglich erscheinende Struktur und die große Anzahl möglicher Disulfidbrücken in Frage gestellt. Außerdem beeinflusst das jeweilige Auswertungsprogramm mit seinen spezifischen Algorithmen und die Auswahl der Referenzspektren von röntgenkristallographisch aufgeklärten Proteinen die Strukturvorhersage eines Proteins unbekannter Konformation (Einen Überblick zur Problematik der computergestützten Auswertung von CD-Spektren zur Konformationsvorhersage bietet: Greenfield, 1996).

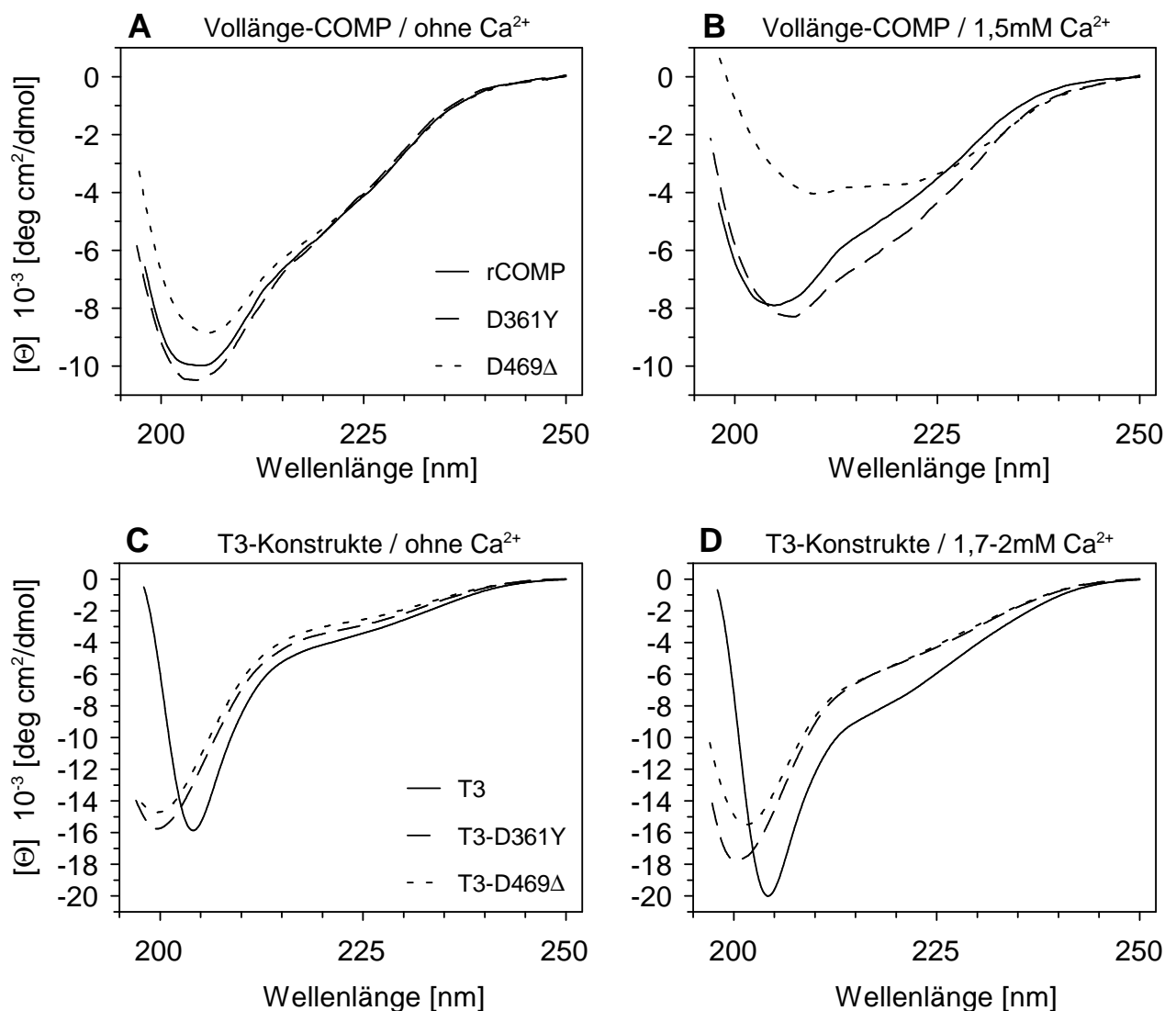


Abb. 41: Die CD-Spektren von rekombinantem COMP in An- und Abwesenheit von Calcium. Die gezeigten CD-Spektren sind Abb. 24 und Abb. 25 entnommen und wurden hier nur neu kombiniert. Wildtyp-COMP (durchgezogene Linie), die Mutation D361Y (unterbrochene Linie) und D469 Δ (gestrichelte Linie) wurden entweder als Volllänge-Konstrukt (oben: A, B) oder als T3-Konstrukt (unten: C, D) in TBS vor (A, C) und nach (B, D) Zugabe von Ca^{2+} gemessen. Die Ca^{2+} -Konzentration der T3-Konstrukte in (D) betrug 1,8mM Ca^{2+} bei T3, 2mM Ca^{2+} bei T3-D361Y und 1,7mM Ca^{2+} bei D469 Δ .

Deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten zeigen sich im Umfang der Ca^{2+} -induzierten Elliptizitätsänderung der T3-Konstrukte (Tab. 6): Bei T3 beträgt die Änderung 50%, bei den mutierten Typ 3 Domänen (T3-D361Y und T3-D469Δ) nur 40% (bezogen auf den Ca^{2+} -gesättigten Zustand); somit ist bei den T3-Mutanten der Umfang der Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung reduziert.

Analog zeigt die Fluoreszenz-Spektroskopie der T3-Konstrukte, daß auch die Ca^{2+} -induzierte Änderung der Fluoreszenz-Intensität bei den Mutanten (T3-D361Y: $\Delta F = 20\%$ und T3-D469Δ: $\Delta F = 320\%$) im Vergleich zum Wildtyp (T3: $\Delta F = 490\%$) eingeschränkt ist (Tab. 5, 6). Im Ca^{2+} -freien Zustand liegen die Maxima der Emission bei 353nm, aber bei den Mutanten ist die Ca^{2+} -induzierte Verschiebung der Maxima zum kurzwelligen hin geringer als beim Wildtyp (T3-D361Y: $\Delta\lambda \leq 1\text{nm}$ / T3-D469Δ: $\Delta\lambda = 3\text{nm}$ / T3: $\Delta\lambda = 7\text{nm}$). Bei Tryptophan wird eine Blau-Verschiebung des Emissions-Maximums (hier: Trp344 in Gegenwart von Ca^{2+}) durch eine gestiegene Hydrophobizität der Mikroumgebung verursacht (Schmid, 1989). Demnach zeigen die Mutanten also auch in den Fluoreszenz-Untersuchungen einen im Umfang eingeschränkten Konformationswechsel.

Durch Gleichgewichtsdialyse in Gegenwart von 1mM Ca^{2+} wurde die Anzahl von Ca^{2+} -Bindungsstellen in der Typ 3 Domäne bestimmt: T3 bindet $12 \pm 2 \text{ Ca}^{2+}$, bei T3-D361Y sind es $6 \pm 2 \text{ Ca}^{2+}$, und T3-D469Δ bindet $8 \pm 2 \text{ Ca}^{2+}$ (vgl. 3.13, Abb. 31). Die ermittelte Anzahl von 12 Ca^{2+} -Bindungsstellen bei T3 steht in Einklang mit dem von Lawler (Lawler und Hynes, 1986) bzw. Misenheimer und Mosher (Misenheimer und Mosher, 1995) vorgeschlagenen Modell von 13 Ca^{2+} -Bindungsstellen, die in acht Typ 3 Motiven angeordnet sind. Chen *et al.* wiesen jüngst in rekombinant exprimiertem humanem Volllänge-COMP 10 Ca^{2+} -Bindungsstellen pro Untereinheit nach, und eine dem Konstrukt D469Δ entsprechenden Deletionsmutante besaß nur 7 Ca^{2+} -Bindungsstellen pro Untereinheit (Chen *et al.*, 2000); allerdings können die zweite und dritte EGF-Domäne in den Volllängekonstrukten wahrscheinlich ebenfalls Ca^{2+} binden. Im Gegensatz dazu publizierten Maddox *et al.* kürzlich, daß in der humanen, rekombinant exprimierten Typ 3 Domäne des Wildtyps 17 Ca^{2+} -Bindungsstellen existieren und die Einführung der PSACH-assoziierten Mutation D446N zu einer Reduktion auf acht Bindungsstellen führt (Maddox *et al.*, 2000).

Die Affinität und Kooperativität der Ca^{2+} -Bindung wurden durch Analyse der Elliptizitätsänderung als Funktion der Ca^{2+} -Konzentration bestimmt. Die resultierende Bindungskurve lässt sich nur zufriedenstellend durch Anpassung biphasischer, hochgradig kooperativer Bindungsmodelle beschreiben. An dem Ca^{2+} -induzierten Konformationswechsel der Typ 3 Domäne sind also mindestens zwei verschieden affine und kooperative Klassen von Ca^{2+} -Bindungsstellen beteiligt (Tab. 6).

Die Einführung der Punktmutationen in die Typ 3 Domäne führt überraschenderweise nicht zum Verlust der Kooperativität, vielmehr bleiben vom Konformationswechsel der hochaffinen Bindung ($K_{d1} \sim 0,28\text{mM}$) 69% bei T3-D361Y und 88% bei T3-D469Δ erhalten. Bei den Mutanten nimmt die Konformationsänderung, die durch niederaffine Ca^{2+} -Bindung hervorgerufen wird, relativ zu: Entweder werden also hochaffine Bindungsstellen zumindest teilweise in niederaffine umgewandelt, und dabei sinkt die Affinität

der betroffenen Bindungsstellen auf ein Zehntel (T3-D361Y) bis Fünftel (T3-D469Δ). Oder die verbleibenden niederaffinen Bindungsstellen zeigen einen veränderten Ca^{2+} -induzierten Konformationswechsel. In jedem Fall ist die physiologische Relevanz der niederaffinen Ca^{2+} -Bindung mit K_{d2} -Werten im millimolaren Bereich unklar.

Auch die Fluoreszenzänderung von Trp 344 bei Ca^{2+} -Bindung lässt sich nur mit einer hoch kooperativen Bindung beschreiben; die Anpassung an ein biphasisches Bindungsmodell ergibt, daß bei T3 94% der beobachteten Fluoreszenzänderung durch eine hochaffine Bindungsstelle ($K_{d1} = 0,24\text{mM}$, $n_{H1} = 5,9$) hervorgerufen werden. Der Hillkoeffizient kann maximal den Wert der Anzahl der beteiligten Bindungsstellen annehmen, also müssen bei T3 mindestens sechs, und bei T3-D469Δ ($K_{d1} = 0,24\text{mM}$, $n_{H1} = 8$) mindestens acht Ca^{2+} -Bindungsstellen die lokale Konformation von Trp344 beeinflussen; dies stimmt sehr gut mit der Bestimmung der Bindungsstellen-Anzahl durch Gleichgewichtsdialyse überein.

Die Wechselwirkungen zwischen den Typ 3 Motiven reichen relativ weit: Verglichen mit dem Wildtyp reduziert die Deletion im 7. Typ 3 Motiv von T3-D469Δ den Umfang der Fluoreszenzänderung von Trp344 im 3. Typ 3 Motiv auf ~65%. Bei T3-D361Y ist die Mutation in der zu Trp344 benachbarten Ca^{2+} -Bindungsstelle lokalisiert und reduziert - verglichen zum Wildtyp - den Umfang der Fluoreszenzänderung auf 4% und die Affinität auf ein Fünftel ($K_{d1} = 1,14\text{mM}$, $n_{H1} = 3,6$). Dies kann die Folge der räumlichen Nähe des untersuchten Tryptophans zur Mutation sein: Die Mutationen verändern die Konformation lokal stärker als in entfernteren Bindungsstellen.

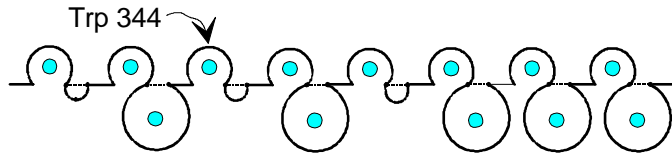
Der Verlust mehrerer Ca^{2+} -Bindungsstellen durch eine einzige Punktmutation und die hohen Hill-Koeffizienten der Bindung weisen darauf hin, daß die hochaffinen Bindungsstellen in mindestens zwei unabhängigen, kooperativen Systemen organisiert sind, daß sich die Konformationsänderungen jedoch - wie die Fluoreszenzspektroskopie zeigt - über eine größere Entfernung auch auf das benachbarte System auswirken können; ob diese Systeme unabhängig faltende Einheiten - also Domänen - darstellen, kann nur in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Die Biphasigkeit der Ca^{2+} -Bindungskurven bei Fluoreszenz- und CD-Messungen zeigt, daß die hoch- und niederaffine Ca^{2+} -Bindung durch voneinander unabhängige Bindungsstellen vermittelt wird.

In einem Modell, mit dem sich die Ca^{2+} -Bindungsdaten erklären lassen (Abb. 42), ist in der Mutante T3-D361Y das aminoterminalen Bindungsstellen-System gestört, das im Wildtyp acht hochaffine Ca^{2+} -Bindungsstellen umfasst und den größeren Anteil zu der im CD beobachteten hochaffinen Konformationsänderung beisteuert. Den carboxyterminalen Bereich der Typ 3 Domäne bildet ein System aus sechs hochaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen, das bei der Mutante T3-D469Δ verändert ist, und keine hochaffine Ca^{2+} -Bindung mehr aufweist. Die niederaffinen Bindungsstellen lassen sich anhand der vorliegenden Daten nicht den verschiedenen Bereichen der Typ 3 Domäne zuordnen. Vermutlich werden durch die Mutation die hochaffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen in niederaffine umgewandelt oder gehen vollständig verloren.

Die Sequenz der Typ 3 Motive weist eine hohe Homologie zum Ca^{2+} -Bindungsmotiv der EF-Hand auf, allerdings fehlen die für die EF-Hand typischen, das Ca^{2+} -Bindungsmotiv flankierenden α -Helices ('Helix-

Schleife-Helix'-Motiv); damit stellen die Typ 3 Motive möglicherweise eine bloße Aneinanderreihung der 'Schleifen' mit unbekannter Struktur dar.

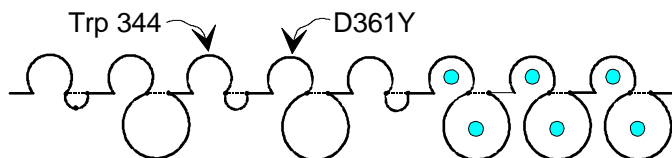
Wildtyp T3: Bindung von $12 \pm 2 \text{ Ca}^{2+}$



50% Elliptizitätsänderung im CD; davon 80% durch hochaffine Bindung: $K_{d1} = 0,30 \text{ mM}$, $n_{H1} = 3,7$ (niederaffine Bdg.: $K_{d2} = 4,1 \text{ mM}$, $n_{H2} = 1,2$)

490% Intensitätsänderung der Fluoreszenz, davon 94% durch hochaffine Bdg.: $K_{d1} = 0,24 \text{ mM}$, $n_{H1} = 5,9$; Emissions-Maximum verlagert sich um 7nm;

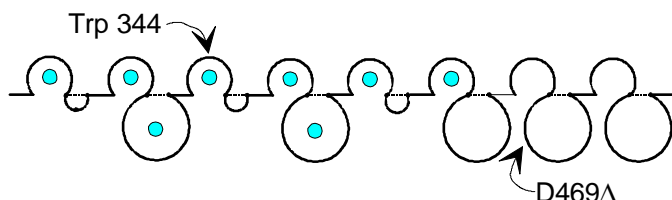
T3-D361Y: Bindung von $6 \pm 2 \text{ Ca}^{2+}$



40% Elliptizitätsänderung im CD; davon 55% durch hochaffine Bdg.: $K_{d1} = 0,25 \text{ mM}$, $n_{H1} = 4,5$ (niederaffine Bdg.: $K_{d2} = 2,7 \text{ mM}$, $n_{H2} = 1,5$)

20% Intensitätsänderung der Fluoreszenz, monophasische niederaffine Bdg.: $K_{d1} = 1,14 \text{ mM}$, $n_{H1} = 3,6$ Emissions-Maximum verlagert sich um $\leq 1 \text{ nm}$;

T3-D469Δ: Bindung von $8 \pm 2 \text{ Ca}^{2+}$



40% Elliptizitätsänderung im CD; davon 70% durch hochaffine Bdg.: $K_{d1} = 0,28 \text{ mM}$, $n_{H1} = 3,7$ (niederaffine Bdg.: $K_{d2} = 1,5 \text{ mM}$, $n_{H2} = 2,8$)

320% Intensitätsänderung der Fluoreszenz, davon 80% durch hochaffine Bdg.: $K_{d1} = 0,24 \text{ mM}$, $n_{H1} = 8$ Emissions-Maximum verlagert sich um 3nm;

Abb. 42: Modell der Typ 3 Motive und die Auswirkung der Mutationen. Die Untergliederung in einzelne Bindungsmotive bzw. -stellen und deren Anzahl orientiert sich an dem für Thrombospondin 1 vorgeschlagenen Modell (Lawler und Hynes, 1986; Misenheimer und Mosher, 1995); zur Darstellung vgl. Abb. 4. Die Lokalisation des fluoreszierenden Tryptophans Trp344 und der beiden untersuchten Mutationen sind durch Pfeile markiert.

Mörgelin *et al.* bestimmten elektronenmikroskopisch die Länge von Ratten-COMP: Die vier EGF- und die Typ 3 Domäne besitzen eine stabförmige, $25,6 \pm 6 \text{ nm}$ lange und $1,2 \text{ nm}$ dicke Gestalt (Mörgelin *et al.*, 1992). Legt man die Struktur der EGF-Domäne von humanem Faktor IX zugrunde, sind die vier globulären EGF-Domänen aneinandergereiht 12 nm lang (Baron *et al.*, 1992). Die Typ 3 Domäne wäre damit $13,6 \text{ nm}$ lang, was gut mit der gemessenen Länge von $14,2 \pm 1,7 \text{ nm}$ für rekombinantes T3 übereinstimmt (Maddox *et al.*, 2000). Bei 260 Aminosäuren (AS) bedeutet das durchschnittlich $18,5 \text{ AS/nm}$; die globuläre TC-Domäne ist dichter gepackt: 240 AS bei $4,8 \text{ nm}$ Durchmesser (Mörgelin *et al.*, 1992).

4.4 Die Mutationen beeinflussen die Bindung von COMP an Kollagen

Die elektronenmikroskopische Visualisierung der COMP-Kollagen-Interaktion zeigt, daß die Bindung über die carboxyterminale globuläre TC-Domäne von COMP erfolgt; dies steht in Einklang mit Untersuchungen der Bindung von Rinder-COMP an Kollagen I und II (Rosenberg *et al.*, 1998). Die Kollagenbindung wird durch die Mutationen in der benachbarten Ca^{2+} -bindenden Typ 3 Domäne beeinflusst; die Entdeckung von PSACH- und MED-assoziierten Mutationen in der TC-Domäne (Briggs *et al.*, 1998; Deere *et al.*, 1998; Deere *et al.*, 1999) lässt sich dahingehend interpretieren, daß Mutationen in beiden COMP-Domänen vermutlich durch Konformationsänderungen die Kollagenbindung der TC-Domäne beeinflussen. Das bedeutet im Umkehrschluss, daß sich die Konformation der Typ 3 Domäne auf die Eigenschaften - hier die Bindung an Kollagene - der TC-Domäne auswirkt.

Die Kollagenbindung ist Zn^{2+} -abhängig, und die zur halbmaximalen Bindung an Kollagen I nötige Zinkkonzentration ist bei rCOMP niedriger ($[\text{Zn}^{2+}]_{0,5} = 10\mu\text{M}$) als bei D361Y ($[\text{Zn}^{2+}]_{0,5} = 20\mu\text{M}$) und D469Δ ($[\text{Zn}^{2+}]_{0,5} = 40\mu\text{M}$). An Kollagen II und IX bindet COMP erst bei deutlich höheren Zinkkonzentrationen; in Gegenwart hoher Zn^{2+} -Konzentrationen (0,5mM) binden alle COMP-Konstrukte mit einer apparenten Affinität im nanomolaren Bereich an Kollagen I ($K_{\text{app}} = 0,4\text{-}0,9\text{nM}$) und Kollagen IX ($K_{\text{app}} = 0,4\text{-}3,5\text{nM}$). Die intrinsische Fluoreszenz und Elliptizität der T3-Konstrukte ändert sich weder in Ca^{2+} -freiem, noch in Ca^{2+} -gesättigtem Zustand bei Zugabe von Zink; das legt nahe, daß Zn^{2+} seinen Effekt in der TC-Domäne entfaltet.

Wie sieht die Situation im Knorpel aus? In der Synovialflüssigkeit wurden Zinkkonzentrationen von 9-25 μM gemessen (Buneaux *et al.*, 1978), und im Knorpel Gesamtkonzentrationen von 15-120 μM Zn^{2+} (Schor *et al.*, 1973). Unter diesen Bedingungen würden die COMP-Mutanten deutlich schwächer als rCOMP an Kollagen II und IX binden. In den verschiedenen Schichten des Gelenkknorpels variiert die Konzentration von Zn^{2+} , so wurden im hypertrophen Knorpel bis zu 1400 μM Gesamt-Zink gemessen; durchschnittlich steht dem Zn^{2+} die 50-fache Konzentration Ca^{2+} gegenüber (Rizzo *et al.*, 1995). Setzt man Konzentrationen von 1,2mM Ca^{2+} und 25 μM Zn^{2+} als typisch voraus, würde nach den *in vitro* gewonnenen Daten COMP bei hohen Konzentrationen aggregieren und eine COMP-Kollagen-Interaktion wäre nicht möglich. Da sich COMP mit EDTA aus Gewebe extrahieren lässt (Mörgelin *et al.*, 1992; Di Cesare *et al.*, 1994b) müssen divalente Kationen bei der Verankerung von COMP in der ECM eine wichtige Rolle spielen; die freie COMP-Konzentration muss im Gewebe daher unterhalb des (in dieser Arbeit nicht bestimmten) Schwellenwertes liegen, ab dem spontane Selbstaggregation beginnt. Bei 25 μM Zn^{2+} würde rCOMP im Gegensatz zu mutiertem COMP an Kollagen binden.

4.5 Modelle zur Pathogenese von PSACH und MED

Die hier gezeigte hochaffine COMP-Kollagen-Interaktion könnte *in vivo* bei der Vernetzung tripelhelikalen Kollagens oder bei der Kollagen-Fibrillenbildung eine Rolle spielen: Indem die Mutationen die Menge des Kollagen-gebundenen COMP reduzieren, könnte die Bildung und Organisation der Kollagen I- und II-Fibrillen gestört sein. Dem Kollagen IX wird eine stabilisierende Funktion bei der Kollagen-Fibrillogenese im Knorpel zugewiesen (Bruckner *et al.*, 1988), und die Interaktion von Kollagen IX mit weiteren Bindungspartnern für die 'Verklebung' von Fibrillen im Knorpel verantwortlich gemacht (Smith und Brandt, 1992). Auch die Beobachtung, daß transgene Mäuse mit inaktiviertem oder mutiertem Kollagen IX-Gen Arthrose entwickeln (Bruckner *et al.*, 1988; Nakata *et al.*, 1993), unterstreicht die Bedeutung von Kollagen IX für die Stabilität und Integrität des Kollagen-Netzwerkes in der ECM des Knorpels.

Somit wäre es möglich, daß die Kollagene IX und II durch ihre Bindung an COMP relativ zueinander in eine definierte Position gebracht werden, anschließend direkt miteinander interagieren und Fibrillen bilden. In den mutierten Pentameren wären eine oder mehrere TC-Domänen nicht mehr zur Kollagenbindung fähig und würden einen dominant negativen Effekt ausüben können; im Fall von Chondrocyten ist sogar unsicher, ob mutiertes COMP überhaupt sezerniert wird. In der Folge wären Struktur und Stabilität von Knorpel, Bändern und Sehnen verändert; überdehnbare Bänder und früh einsetzende Arthrose sind charakteristische Symptome bei PSACH und MED.

Insofern könnte man die Pathogenese von PSACH und MED also auf den Verlust der physiologischen Funktion von COMP zurückzuführen; die unauffällige Entwicklung von transgenen Mäusen mit inaktiviertem COMP-Gen zeigt aber, daß es das mutierte Protein, und nicht die Abwesenheit von COMP ist, die den PSACH- bzw. MED-Phänotyp hervorrufen (L. Svensson und Å. Oldberg, persönliche Mitteilung; J. Hecht, unveröffentlichte Beobachtungen, zitiert nach: Stevens, 1999). Dabei kann eine Rolle spielen, daß die durch die Mutationen beeinflusste Funktion redundant ist; bei völliger Abwesenheit von COMP könnte im Knorpel beispielsweise Thrombospondin 1 mit seiner zu COMP hochgradig homologen Typ 3 Domäne und TC-Domäne eine Ersatzrolle spielen und die Funktion bereitstellen, die sonst COMP ausübt.

Eine andere oder auch zusätzliche Erklärung bietet sich bei Betrachtung der PSACH/MED-spezifischen lamellären Ablagerungen im rER von Chondrocyten: Mutationen in COMP oder in Kollagen IX führen zum Phänotyp 'MED', und in den ER-Ablagerungen lassen sich genau diese beiden Proteine - neben Aggrecan - nachweisen. Wenn COMP und andere sekretorische Proteine im ER zurückgehalten werden und dadurch zelluläre Funktionen der betroffenen Chondrocyten beeinträchtigt sind, würde das auch die reduzierte Proliferation der Knorpelzellen und den gestörten Aufbau der Wachstumsfuge erklären (Briggs *et al.*, 1995; Hecht *et al.*, 1998b). Da derzeit keine Möglichkeit besteht, in Zellen oder im Gewebe mutiertes COMP vom Wildtyp zu unterscheiden, ist unklar, ob bzw. in welchem Maß mutiertes COMP sezerniert wird.

Die Zellen von Knorpel, Bändern und Sehnen von Patienten waren *in vitro* in der Lage, COMP zu sezernieren (Delot *et al.*, 1998; Hecht *et al.*, 1998a); im Fall der Chondrozyten ist dies wahrscheinlich die Folge der artifiziellen Kulturbedingungen, unter denen sie sich zu einem Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp dedifferenzieren (Hecht *et al.*, 1998b). *In vivo* wurde COMP auch extrazellulär in Sehnen von PSACH-Patienten gefunden, was im Einklang mit dem Fehlen der rER-Ablagerungen in Tenocyten steht (Maddox *et al.*, 1997); also verhindert die Mutation nicht die Sekretion *per se*, sondern nur in Chondrocyten. Eine pathologische Interaktion mit spezifisch im Knorpel exprimierten Molekülen scheint also die Ursache der rER-Ablagerungen darzustellen, und Kollagen IX könnte dafür ein prominenter Kandidat sein (s.u.).

Zumindest in Sehnen könnte sezerniertes, mutiertes COMP unphysiologische Wechselwirkungen ausüben und so den dominant-negativen Effekt verursachen. Histologisch ließ sich dagegen kein COMP in der Extrazellulärmatrix des Knorpels von Patienten (Maddox *et al.*, 1997) oder allenfalls im Bereich der Nachweisgrenze (Delot *et al.*, 1998) nachweisen. Diese Beobachtungen wurden als eine Folge der Retardierung im rER erklärt, aber die reduzierte Affinität von COMP zu anderen ECM-Bestandteilen (und damit seine geschwächte Verankerung) könnte auch zu seinem Verlust beim Schneiden und Färben der Gewebeschnitte führen.

Eine erhöhte Sensitivität gegenüber Proteasen ist eine weitere Theorie, die auf der Beobachtung fußt, das viele Proteine durch die Ca^{2+} -Bindung stabilisiert werden und in diesem Zustand gegenüber Proteasen weniger empfindlich sind. In der Tat wurde *in vitro* gezeigt, daß bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen D469Δ im Vergleich zu rCOMP und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Trypsin aufweist (Chen *et al.*, 2000).

Die Affinität der in dieser Arbeit erstmals gezeigten Zn^{2+} -abhängigen Bindung von COMP an Kollagen IX liegt im nanomolaren Bereich. Interessanterweise wurden die PSACH/MED-spezifischen Ablagerungen im rER nur in den Zelltypen gefunden, von denen bekannt ist, daß sie COMP und Kollagen IX ko-exprimieren: Chondrocyten, sowie die Faserknorpel-Zellen an der Insertionsstelle von Bändern (Maynard *et al.*, 1972; Sagarriga Visconti *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997). Die Tenocyten und Ligamentzellen, die weiter entfernt von diesen Insertionsstellen liegen, weisen keine rER-Ablagerungen auf und exprimieren auch kein Kollagen IX (Maddox *et al.*, 1997; Maynard *et al.*, 1972). Die Interaktion von COMP und Kollagen IX scheint also eine zentrale Rolle bei der Entstehung der rER-Ablagerungen und der Entstehung des Krankheitsbildes zu spielen. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, binden mutiertes und Wildtyp COMP mit ähnlicher Affinität an Kollagen IX. Die Bildung der rER-Ablagerungen müsste daher durch einen weiteren Faktor im rER der Chondrocyten und Faserknorpel-Zellen mitverursacht werden; beispielsweise könnten Chaperone an die mutierten COMP-Moleküle und anschließend an Kollagen IX oder direkt an Komplexe aus COMP und Kollagen IX binden. Können solche Komplexe nicht wieder aufgelöst oder durch geordnete Degradation abgebaut werden, könnte es zur Bildung der angesprochenen lamellären Ablagerungen kommen. Bei MED-assoziierten Mutationen des Kollagen IX, die ebenfalls lamelläre Einschlüsse im rER bilden, ist ein solches Szenario wahrscheinlich (Bönnemann *et al.*, 2000).

5. Zusammenfassung

Die Pseudoachondroplasie und Multiple Epiphysäre Dysplasie sind zwei dominant negativ vererbte Erkrankungen des skeletalen Systems, die sich in Zwergwuchs, vermindertem Längenwachstum der Röhrenknochen, Gelenksdeformationen und früh einsetzender Arthrose äußern. Im rER der Chondrocyten bilden sich eigentümliche Ablagerungen, die COMP, Aggrecan und Kollagen IX enthalten. Beide Krankheiten zeigen eine große, sich überlappende Bandbreite des Phänotyps. Als Ursache wurden mittlerweile 50 verschiedene Mutationen im Cartilage Oligomeric Matrix Protein identifiziert, einem pentameren Glykoprotein der Extrazellulärmatrix von Knorpel, Sehnen und Bändern; MED-assoziierte Mutationen wurden auch im Kollagen IX gefunden. In der Mehrzahl der COMP-Mutationen sind einzelne Aminosäuren betroffen, von denen eine Beteiligung an der Ca^{2+} -Bindung in der Typ 3 Domäne postuliert wird. Die molekulare Pathogenese von MED bzw. PSACH und die genaue Funktion von COMP sind unbekannt, aber es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von COMP an der Fibrillogenese von Kollagen.

Um die molekularen Mechanismen zu analysieren, die PSACH und MED zugrundeliegen, wurden zwei repräsentative COMP-Mutationen (D361Y und D469Δ) ausgewählt, um die von ihnen verursachten Auswirkungen auf die Konformation, Ca^{2+} - und Kollagen-Bindung von COMP zu untersuchen. Dazu wurde das pentamere COMP und die einzelne Typ 3 Domäne als Wildtyp bzw. in der mutierten Form rekombinant in Nierenzellen exprimiert und aufgereinigt.

Erstmals ließ sich die postulierte Ca^{2+} -Bindung der Typ 3 Domäne bestätigen: Es wurden 12 ± 2 Ca^{2+} -Bindungsstellen nachgewiesen. Die Ergebnisse legen nahe, daß die Bindungsstellen in zwei verschiedenen Systemen zusammengefasst sind, und sich beide Bindungsstellen-Systeme in ihrer Struktur gegenseitig beeinflussen. Die Ca^{2+} -Bindung erfolgt hochgradig kooperativ und führt zu einem umfangreichen Konformationswechsel der Typ 3 Domäne; dabei ist die Ca^{2+} -Affinität mit einem apparenten K_d um 0,3mM hoch genug, um unter physiologischen Bedingungen eine Ca^{2+} -Sättigung des Proteins herbeizuführen. Es wurde nachgewiesen, daß in Anwesenheit von Zn^{2+} COMP mit nanomolarer Affinität an Kollagen I, II und IX bindet; die Bindung des Kollagens, wahrscheinlich auch die von Zink, erfolgt durch die carboxyterminale TC-Domäne von COMP.

Die Punktmutationen führen zu einer nur subtil veränderten Gesamtstruktur; sie äußern sich hingegen in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} in einer umfassenden Veränderung der lokalen Struktur der Typ 3 Domäne, und sie schränken den Umfang der Ca^{2+} -induzierten Konformationsänderung deutlich ein. Durch beide Mutationen wird jeweils eines der beiden Bindungsstellen-Systeme derart gestört, daß ein Verlust von fünf bzw. sieben Ca^{2+} -Bindungsstellen resultiert; dabei werden wahrscheinlich hochaffine Bindungsstellen in niederaffine umgewandelt.

Mutiertes COMP bindet erst bei deutlich höheren Zn^{2+} -Konzentrationen an tripelhelikales Kollagen; bei hohen Zink-Konzentrationen im Sättigungsbereich binden die mutierten Proteine dagegen in einem dem Wildtyp vergleichbaren Maß an Kollagen I, II und IX. Die Veränderung der Kollagenbindung durch die Mutationen im Bereich der Ca^{2+} -Bindungsstellen beweist, daß die Typ 3 Domäne die carboxyterminale TC-Domäne beeinflusst.

Vor dem Hintergrund, daß Mutationen in COMP und in Kollagen IX den gleichen, mit Ablagerungen im rER von Chondrocyten einhergehenden Phänotyp verursachen können, deutet diese Arbeit darauf hin, daß die Interaktion von Kollagen IX mit COMP eine zentrale Position bei der Pathogenese von Pseudoachondroplasie und Multipler Epiphysärer Dysplasie einnimmt.

6. Literatur

- Andrade, M.A., Chacon, P., Merelo, J.J. und Moran, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.*, 6, 383-390.
- Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M.J., Kadler, K.E. und Shuttleworth, A. (1998) *The Extracellular Matrix Factsbook*. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Ballo, R., Briggs, M.D., Cohn, D.H., Knowlton, R.G., Beighton, P.H. und Ramesar, R.S. (1997) Multiple epiphyseal dysplasia, ribbing type: a novel point mutation in the COMP gene in a South African family. *Am. J. Med. Genet.*, 68, 396-400.
- Baron, M., Norman, D.G., Harvey, T.S., Handford, P.A., Mayhew, M., Tse, A.G., Brownlee, G.G. und Campbell, I.D. (1992) The three-dimensional structure of the first EGF-like module of human factor IX: comparison with EGF und TGF- α . *Protein. Sci.*, 1, 81-90.
- Bönnemann, C.G., Cox, G.F., Shapiro, F., Wu, J.J., Feener, C.A., Thompson, T.G., Anthony, D.C., Eyre, D.R., Darras, B.T. und Kunkel, L.M. (2000) A mutation in the alpha 3 chain of type IX collagen causes autosomal dominant multiple epiphyseal dysplasia with mild myopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97, 1212-1217.
- Briggs, M.D., Hoffman, S.M., King, L.M., Olsen, A.S., Mohrenweiser, H., Leroy, J.G., Mortier, G.R., Rimoin, D.L., Lachman, R.S., Gaines, E.S., Cekliniak, R.G., Knowlton, R.G. und Cohn, D.H. (1995) Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat. Genet.*, 10, 330-336.
- Briggs, M.D., Mortier, G.R., Cole, W.G., King, L.M., Golik, S.S., Bonaventure, J., Nuytinck, L., De Paepe, A., Leroy, J.G., Biesecker, L., Lipson, M., Wilcox, W.R., Lachman, R.S., Rimoin, D.L., Knowlton, R.G. und Cohn, D.H. (1998) Diverse mutations in the gene for cartilage oligomeric matrix protein in the pseudoachondroplasia-multiple epiphyseal dysplasia disease spectrum. *Am. J. Hum. Genet.*, 62, 311-319.
- Brown, E.M., Vassilev, P.M. und Hebert, S.C. (1995) Calcium ions as extracellular messengers. *Cell*, 83, 679-682.
- Bruckner, P., Mendler, M., Steinmann, B., Huber, S. und Winterhalter, K.H. (1988) The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.*, 263, 16911-16917.
- Bruckner, P. und van der Rest, M. (1994) Structure and function of cartilage collagens. *Microsc. Res. Tech.*, 28, 378-384.
- Bruckner, P., Vaughan, L. und Winterhalter, K.H. (1985) Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 82, 2608-2612.

- Brunner, H. und Dransfeld, K. (1983) *Structure Determination of Biomolecules by Physical Methods. Light Scattering by Macromolecules*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.
- Buneaux, F., Buneaux, J.J., Fabiani, P. und Galmiche, P. (1978) Zinc and enzymes in the synovial fluid and blood in various types of rheumatism. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.*, 45, 699-701.
- Cantor, C.R.a.S., P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, part II. Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Chen, H., Deere, M., Hecht, J.T. und Lawler, J. (2000) Cartilage oligomeric matrix protein is a calcium binding protein and a mutation in its type 3 repeats causes conformational changes. *J. Biol. Chem.*, in press.
- Cohn, D.H., Briggs, M.D., King, L.M., Rimoin, D.L., Wilcox, W.R., Lachman, R.S. und Knowlton, R.G. (1996) Mutations in the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 785, 188-194.
- Cremer, M.A., Rosloniec, E.F. und Kang, A.H. (1998) The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J. Mol. Med.*, 76, 275-288.
- Danielson, K.G., Baribault, H., Holmes, D.F., Graham, H., Kadler, K.E. und Iozzo, R.V. (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell. Biol.*, 136, 729-743.
- Deere, M., Sanford, T., Ferguson, H.L., Daniels, K. und Hecht, J.T. (1998) Identification of twelve mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in patients with pseudoachondroplasia [In Process Citation]. *Am. J. Med. Genet.*, 80, 510-513.
- Deere, M., Sanford, T., Francomano, C.A., Daniels, K. und Hecht, J.T. (1999) Identification of nine novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein in patients with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 85, 486-490.
- Delot, E., Brodie, S.G., King, L.M., Wilcox, W.R. und Cohn, D.H. (1998) Physiological and pathological secretion of cartilage oligomeric matrix protein by cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 273, 26692-26697.
- Delot, E., King, L.M., Briggs, M.D., Wilcox, W.R. und Cohn, D.H. (1999) Trinucleotide expansion mutations in the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 123-128.
- Di Cesare, P.E., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S. und Paulsson, M. (1994a) Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett.*, 354, 237-240.
- Di Cesare, P.E., Mörgelin, M., Carlson, C.S., Pasumarti, S. und Paulsson, M. (1995) Cartilage oligomeric matrix protein: isolation and characterization from human articular cartilage. *J. Orthop. Res.*, 13, 422-428.
- Di Cesare, P.E., Mörgelin, M., Mann, K. und Paulsson, M. (1994b) Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding. *Eur. J. Biochem.*, 223, 927-937.

- Downing, A.K., Knott, V., Werner, J.M., Cardy, C.M., Campbell, I.D. und Handford, P.A. (1996) Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell*, 85, 597-605.
- Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6, 1948-1954.
- Efimov, V.P., Engel, J. und Malashkevich, V.N. (1996) Crystallization and preliminary crystallographic study of the pentamerizing domain from cartilage oligomeric matrix protein: a five-stranded alpha-helical bundle. *Proteins*, 24, 259-262.
- Efimov, V.P., Lustig, A. und Engel, J. (1994) The thrombospondin-like chains of cartilage oligomeric matrix protein are assembled by a five-stranded alpha-helical bundle between residues 20 and 83. *FEBS Lett.*, 341, 54-58.
- Engel, J. und Furthmayr, H. (1987) Electron microscopy and other physical methods for the characterization of extracellular matrix components: laminin, fibronectin, collagen IV, collagen VI, and proteoglycans. *Methods Enzymol.*, 145, 3-78.
- Fässler, R., Schnegelsberg, P.N., Dausman, J., Shinya, T., Muragaki, Y., McCarthy, M.T., Olsen, B.R. und Jaenisch, R. (1994) Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91, 5070-5074.
- Ferguson, H.L., Deere, M., Evans, R., Rotta, J., Hall, J.G. und Hecht, J.T. (1997) Mosaicism in pseudoachondroplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 70, 287-291.
- Forslind, K., Eberhardt, K., Jonsson, A. und Saxne, T. (1992) Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 31, 593-598.
- Gavel, Y. und von Heijne, G. (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.*, 3, 433-442.
- Gerthsen, C., Kneser, H.O. und Vogel, H. (1989) *Physik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Heidelberg.
- Gilanyi, M., Ikrenyi, C., Fekete, J., Ikrenyi, K. und Kovach, A.G. (1988) Ion concentrations in subcutaneous interstitial fluid: measured versus expected values. *Am. J. Physiol.*, 255, F513-519.
- Gill, S.C. und von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data [published erratum appears in *Anal Biochem* 1990 Sep;189(2):283]. *Anal. Biochem.*, 182, 319-326.
- Greenfield, N.J. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.*, 235, 1-10.
- Hagg, R., Bruckner, P. und Hedbom, E. (1998) Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *J. Cell Biol.*, 142, 285-294.

- Hagg, R., Hedbom, E., Mollers, U., Aszodi, A., Fässler, R. und Bruckner, P. (1997) Absence of the alpha1(IX) chain leads to a functional knock-out of the entire collagen IX protein in mice. *J. Biol. Chem.*, 272, 20650-20654.
- Hecht, J.T., Deere, M., Putnam, E., Cole, W., Vertel, B., Chen, H. und Lawler, J. (1998a) Characterization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in human normal and pseudoachondroplasia musculoskeletal tissues. *Matrix Biol.*, 17, 269-278.
- Hecht, J.T., Montufar-Solis, D., Decker, G., Lawler, J., Daniels, K. und Duke, P.J. (1998b) Retention of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and cell death in redifferentiated pseudoachondroplasia chondrocytes. *Matrix Biol.*, 17, 625-633.
- Hecht, J.T., Nelson, L.D., Crowder, E., Wang, Y., Elder, F.F., Harrison, W.R., Francomano, C.A., Prange, C.K., Lennon, G.G., Deere, M. und Lawler, J. (1995) Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nat. Genet.*, 10, 325-329.
- Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa-Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, Å. und Heinegård, D. (1992) Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J. Biol. Chem.*, 267, 6132-6136.
- Holden, P., Canty, E.G., Mortier, G.R., Zabel, B., Spranger, J., Carr, A., Grant, M.E., Loughlin, J.A. und Briggs, M.D. (1999) Identification of novel pro-alpha2(IX) collagen gene mutations in two families with distinctive oligo-epiphyseal forms of multiple epiphyseal dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.*, 65, 31-38.
- Ikegawa, S., Ohashi, H., Nishimura, G., Kim, K.C., Sannohe, A., Kimizuka, M., Fukushima, Y., Nagai, T. und Nakamura, Y. (1998) Novel and recurrent COMP (cartilage oligomeric matrix protein) mutations in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum. Genet.*, 103, 633-638.
- International Working Group on Constitutional Diseases of Bone, I. (1998) International nomenclature and classification of the osteochondrodysplasias (1997). International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. *Am. J. Med. Genet.*, 79, 376-382.
- Johnson, W.C., Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins*, 7, 205-214.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22, 2577-2637.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. und Timpl, R. (1997) Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett.*, 414, 557-561.
- Kuznetsov, G., Chen, L.B. und Nigam, S.K. (1997) Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 272, 3057-3063.

- Langer, L.O., Jr., Schaefer, G.B. und Wadsworth, D.T. (1993) Patient with double heterozygosity for achondroplasia and pseudoachondroplasia, with comments on these conditions and the relationship between pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia, Fairbank type. *Am. J. Med. Genet.*, 47, 772-781.
- Lawler, J. und Hynes, R.O. (1986) The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell Biol.*, 103, 1635-1648.
- Lohiniva, J., Paassilta, P., Seppanen, U., Vierimaa, O., Kivirikko, S. und Ala-Kokko, L. (2000) Splicing mutations in the COL3 domain of collagen IX cause multiple epiphyseal dysplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 90, 216-222.
- Loughlin, J., Irven, C., Mustafa, Z., Briggs, M.D., Carr, A., Lynch, S.A., Knowlton, R.G., Cohn, D.H. und Sykes, B. (1998) Identification of five novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia [In Process Citation]. *Hum. Mutat.*, Suppl 1, S10-17.
- Maddox, B.K., Keene, D.R., Sakai, L.Y., Charbonneau, N.L., Morris, N.P., Ridgway, C.C., Boswell, B.A., Sussman, M.D., Horton, W.A., Bächinger, H.P. und Hecht, J.T. (1997) The fate of cartilage oligomeric matrix protein is determined by the cell type in the case of a novel mutation in pseudoachondroplasia. *J. Biol. Chem.*, 272, 30993-30997.
- Maddox, B.K., Mokashi, A., Keene, D.R. und Bächinger, H.P. (2000) A cartilage oligomeric matrix protein mutation associated with pseudoachondroplasia changes the structural and functional properties of the type 3 domain. *J. Biol. Chem.*, 275, 11412-11417.
- Malashkevich, V.N., Kammerer, R.A., Efimov, V.P., Schulthess, T. und Engel, J. (1996) The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel? *Science*, 274, 761-765.
- Maurer, P. und Hohenester, E. (1997) Structural and functional aspects of calcium binding in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.*, 15, 569-580; discussion 581.
- Maurer, P., Hohenester, E. und Engel, J. (1996) Extracellular calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 609-617.
- Maynard, J.A., Cooper, R.R. und Ponseti, I.V. (1972) A unique rough surfaced endoplasmic reticulum inclusion in pseudoachondroplasia. *Lab. Invest.*, 26, 40-44.
- Misenheimer, T.M. und Mosher, D.F. (1995) Calcium ion binding to thrombospondin 1. *J. Biol. Chem.*, 270, 1729-1733.
- Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J. und Paulsson, M. (1992) Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. *J. Biol. Chem.*, 267, 6137-6141.

- Muragaki, Y., Mariman, E.C., van Beersum, S.E., Perala, M., van Mourik, J.B., Warman, M.L., Hamel, B.C. und Olsen, B.R. (1996a) A mutation in COL9A2 causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 785, 303-306.
- Muragaki, Y., Mariman, E.C., van Beersum, S.E., Perala, M., van Mourik, J.B., Warman, M.L., Olsen, B.R. und Hamel, B.C. (1996b) A mutation in the gene encoding the alpha 2 chain of the fibril-associated collagen IX, COL9A2, causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Nat. Genet.*, 12, 103-105.
- Nakata, K., Ono, K., Miyazaki, J., Olsen, B.R., Muragaki, Y., Adachi, E., Yamamura, K. und Kimura, T. (1993) Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1(IX) collagen chains with a central deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 90, 2870-2874.
- Newton, G., Weremowicz, S., Morton, C.C., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. und Lawler, J. (1994) Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics*, 24, 435-439.
- Oldberg, Å., Antonsson, P., Lindblom, K. und Heinegård, D. (1992) COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J. Biol. Chem.*, 267, 22346-22350.
- Olsen, B.R. (1997) Collagen IX. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29, 555-558.
- Owen, W.G., Bichler, J., Ericson, D. und Wysokinski, W. (1995) Gating of thrombin in platelet aggregates by pO₂-linked lowering of extracellular Ca²⁺ concentration. *Biochemistry*, 34, 9277-9281.
- Paassilta, P., Lohiniva, J., Annunen, S., Bonaventure, J., Le Merrer, M., Pai, L. und Ala-Kokko, L. (1999) COL9A3: A Third Locus for Multiple Epiphyseal Dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 1036-1044.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.*, 4, 2411-2423.
- Pihlajamaa, T., Perala, M., Vuoristo, M.M., Nokelainen, M., Bodo, M., Schulthess, T., Vuorio, E., Timpl, R., Engel, J. und Ala-Kokko, L. (1999) Characterization of recombinant human type IX collagen. Association of alpha chains into homotrimeric and heterotrimeric molecules. *J. Biol. Chem.*, 274, 22464-22468.
- Poole, A.R., Pidoux, I., Reiner, A. und Rosenberg, L. (1982) An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *J. Cell Biol.*, 93, 921-937.
- Poole, C.A., Flint, M.H. und Beaumont, B.W. (1984) Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J. Anat.*, 138, 113-138.
- Prabakaran, D., Kim, P.S., Dixit, V.M. und Arvan, P. (1996) Oligomeric assembly of thrombospondin in the endoplasmic reticulum of thyroid epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 70, 134-141.
- Provencher, S.W. und Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20, 33-37.

- Rizzo, R., Grandolfo, M., Godeas, C., Jones, K.W. und Vittur, F. (1995) Calcium, sulfur, and zinc distribution in normal and arthritic articular equine cartilage: a synchrotron radiation-induced X-ray emission (SRIXE) study. *J. Exp. Zool.*, 273, 82-86.
- Rosenberg, K., Olsson, H., Mörgelin, M. und Heinegård, D. (1998) Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J. Biol. Chem.*, 273, 20397-20403.
- Ruoslahti, E. (1988) Structure and biology of proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 4, 229-255.
- Sagarriga Visconti, C., Kavalkovich, K., Wu, J. und Niyibizi, C. (1996) Biochemical analysis of collagens at the ligament-bone interface reveals presence of cartilage-specific collagens. *Arch. Biochem. Biophys.*, 328, 135-142.
- Saxne, T. und Heinegård, D. (1992) Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood [published erratum appears in Br J Rheumatol 1993 Mar; 32(3):247]. *Br. J. Rheumatol.*, 31, 583-591.
- Schmid, F.X. (1989) In T. E. Creighton (ed.) *Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes*. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, pp. 251-285.
- Schor, R.A., Prussin, S.G., Jewett, D.L., Ludowieg, J.J. und Bhatnagar, R.S. (1973) Trace levels of manganese, copper, and zinc in rib cartilage as related to age in humans and animals, both normal and dwarfed. *Clin. Orthop.*, 93, 346-355.
- Smith, G.N., Jr. und Brandt, K.D. (1992) Hypothesis: can type IX collagen "glue" together intersecting type II fibers in articular cartilage matrix? A proposed mechanism. *J. Rheumatol.*, 19, 14-17.
- Smith, R.K., Zunino, L., Webbon, P.M. und Heinegård, D. (1997) The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. *Matrix Biol.*, 16, 255-271.
- Spayde, E.C., Joshi, A.P., Wilcox, W.R., Briggs, M., Cohn, D.H. und Olsen, B.R. (2000) Exon skipping mutation in the COL9A2 gene in a family with multiple epiphyseal dysplasia. *Matrix Biol.*, 19, 121-128.
- Spranger, J. (1976) The epiphyseal dysplasias. *Clin. Orthop.*, 46-59.
- Sreerama, N. und Woody, R.W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.*, 209, 32-44.
- Sreerama, N. und Woody, R.W. (1994) Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. *J. Mol. Biol.*, 242, 497-507.
- Stanescu, R., Stanescu, V., Muriel, M.P. und Maroteaux, P. (1993) Multiple epiphyseal dysplasia, Fairbank type: morphologic and biochemical study of cartilage. *Am. J. Med. Genet.*, 45, 501-507.

- Stanescu, V., Maroteaux, P. und Stanescu, R. (1982a) The biochemical defect of pseudoachondroplasia. *Eur. J. Pediatr.*, 138, 221-225.
- Stanescu, V., Stanescu, R. und Maroteaux, P. (1982b) Pathogenesis of pseudoachondroplasia and diastrophic dysplasia. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 104, 385-394.
- Stevens, J.W. (1999) Pseudoachondroplastic dysplasia: an Iowa review from human to mouse [In Process Citation]. *Iowa Orthop. J.*, 19, 53-65.
- Susic, S., Ahier, J. und Cole, W.G. (1998) Pseudoachondroplasia due to the substitution of the highly conserved Asp482 by Gly in the seventh calmodulin-like repeat of cartilage oligomeric matrix protein. *Hum. Mutat.*, Suppl 1, S125-127.
- Susic, S., McGrory, J., Ahier, J. und Cole, W.G. (1997) Multiple epiphyseal dysplasia and pseudoachondroplasia due to novel mutations in the calmodulin-like repeats of cartilage oligomeric matrix protein. *Clin. Genet.*, 51, 219-224.
- Svensson, L., Aszodi, A., Reinholt, F.P., Fässler, R., Heinegård, D. und Oldberg, Å. (1999) Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J. Biol. Chem.*, 274, 9636-9647.
- van der Rest, M., Dublet, B. und Champlaud, M.F. (1990) Fibril-associated collagens. *Biomaterials*, 11, 28-31.
- van der Rest, M. und Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 5, 2814-2823.
- Vaughan, L., Mendler, M., Huber, S., Bruckner, P., Winterhalter, K.H., Irwin, M.I. und Mayne, R. (1988) D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J. Cell Biol.*, 106, 991-997.
- Venjaminov, S.Y., Baikalov, I.A., Shen, Z.M., Wu, C.S. und Yang, J.T. (1993) Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. *Anal. Biochem.*, 214, 17-24.
- Wai, A.W., Ng, L.J., Watanabe, H., Yamada, Y., Tam, P.P. und Cheah, K.S. (1998) Disrupted expression of matrix genes in the growth plate of the mouse cartilage matrix deficiency (cmd) mutant. *Dev. Genet.*, 22, 349-358.
- Wollmer, A. (1983) *Structure Determination of Biomolecules by Physical Methods. ORD and CD Spectroscopy*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio.
- Zaia, J., Boynton, R.E., McIntosh, A., Marshak, D.R., Olsson, H., Heinegård, D. und Barry, F.P. (1997) Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, 272, 14120-14126.
- Zhou, J., Olcese, R., Qin, N., Noceti, F., Birnbaumer, L. und Stefani, E. (1997) Feedback inhibition of Ca²⁺ channels by Ca²⁺ depends on a short sequence of the C terminus that does not include the Ca²⁺-binding function of a motif with similarity to Ca²⁺-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94, 2301-2305.

7.1 Tabelle der bei PSACH und MED nachgewiesenen COMP-Mutationen

Aminosäure	Diagnose	Lokalisation	Häufigkeit	Referenz
D271H	PSACH	1. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1999)
L272P	PSACH	1. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1999)
D290N	PSACH (mild)	1. Typ 3-Motiv	1	(Ikegawa <i>et al.</i> , 1998)
C292W	PSACH	1. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1999)
G299R	PSACH (mild)	2. Typ 3-Motiv	1	(Ikegawa <i>et al.</i> , 1998)
D302V	MED	2. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1999)
G309R	PSACH	2. Typ 3-Motiv	2	(Delot <i>et al.</i> , 1998)
C328R	PSACH	3. Typ 3-Motiv	1	(Briggs <i>et al.</i> , 1995)
D342Y	MED Fairbank	3. Typ 3-Motiv	2	(Briggs <i>et al.</i> , 1995; Cohn <i>et al.</i> , 1996)
D349G	PSACH (mild)	3. Typ 3-Motiv	1	(Ikegawa <i>et al.</i> , 1998)
D361V	MED Fairbank	4. Typ 3-Motiv	1	(Ikegawa <i>et al.</i> , 1998)
D361Y	MED	4. Typ 3-Motiv	1	(Loughlin <i>et al.</i> , 1998)
D367-G368Δ	MED	4. Typ 3-Motiv	1	(Loughlin <i>et al.</i> , 1998)
C371S	MED Fairbank	4. Typ 3-Motiv	1	(Susic <i>et al.</i> , 1997)
D372Δ	PSACH	4. Typ 3-Motiv	3	(Briggs <i>et al.</i> , 1995; Briggs <i>et al.</i> , 1998; Cohn <i>et al.</i> , 1996)
C387G	PSACH (mild)	4. Typ 3-Motiv	1	(Ikegawa <i>et al.</i> , 1998)
[P391-D394Δ] ∇ V	PSACH	5. Typ 3-Motiv	1	(Loughlin <i>et al.</i> , 1998)
Q395-D397Δ	PSACH	5. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1999)
D408Y	MED	5. Typ 3-Motiv	1	(Loughlin <i>et al.</i> , 1998)
G427E	PSACH (mild ?)	6. Typ 3-Motiv	2	(Deere <i>et al.</i> , 1998; Delot <i>et al.</i> , 1998; Loughlin <i>et al.</i> , 1998)
D437G	PSACH	6. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1999)
G440R	PSACH	6. Typ 3-Motiv	2	(Briggs <i>et al.</i> , 1998; Loughlin <i>et al.</i> , 1998)
G440E	PSACH	6. Typ 3-Motiv	4	(Briggs <i>et al.</i> , 1998 Cohn, 1996 #419)
D446N	PSACH	6. Typ 3-Motiv	2	(Delot <i>et al.</i> , 1998; Maddox <i>et al.</i> , 1997)
P449T	PSACH	6. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1998)
N453S	MED Fairbanks	7. Typ 3-Motiv	2	(Briggs <i>et al.</i> , 1998; Cohn <i>et al.</i> , 1996)
E457Δ	PSACH	7. Typ 3-Motiv	1	(Ferguson <i>et al.</i> , 1997)
S459Δ	PSACH	7. Typ 3-Motiv	1	(Hecht <i>et al.</i> , 1995)
C468Y	PSACH	7. Typ 3-Motiv	1	(Hecht <i>et al.</i> , 1995)
D469Δ	PSACH	7. Typ 3-Motiv	23	(Briggs <i>et al.</i> , 1998; Cohn <i>et al.</i> , 1996; Deere <i>et al.</i> , 1998; Hecht <i>et al.</i> , 1998a; Hecht <i>et al.</i> , 1995; Ikegawa <i>et al.</i> , 1998)
D469∇ D	MED	7. Typ 3-Motiv	2	(Cohn <i>et al.</i> , 1996; Delot <i>et al.</i> , 1998)
D469∇ DD	PSACH severe	7. Typ 3-Motiv	1	(Delot <i>et al.</i> , 1998)
D472Y	PSACH	7. Typ 3-Motiv	1	(Hecht <i>et al.</i> , 1995)
D473G	PSACH severe	7. Typ 3-Motiv	1	(Ikegawa <i>et al.</i> , 1998)
D473N	PSACH	7. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1998)
D475N	PSACH	7. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1998)
D482G	PSACH	7. Typ 3-Motiv	1	(Susic <i>et al.</i> , 1998)
D507G	PSACH	8. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1998)
D509A	PSACH	8. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1998)
D509G	PSACH	8. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1998)
D511H	PSACH	8. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1998)
V513-K516Δ	PSACH (mild)	8. Typ 3-Motiv	1	(Susic <i>et al.</i> , 1997)
D518N	PSACH	8. Typ 3-Motiv	2	(Deere <i>et al.</i> , 1998; Ikegawa <i>et al.</i> , 1998)
D518H	PSACH	8. Typ 3-Motiv	1	(Deere <i>et al.</i> , 1999)
N523K	MED Ribbing	8. Typ 3-Motiv	1	(Ballo <i>et al.</i> , 1997)
T527A	PSACH	8. Typ 3-Motiv (TC ?)	1	(Hecht <i>et al.</i> , 1998a)
E583K	PSACH	TC-Domäne	1	(Deere <i>et al.</i> , 1999)
T585M	PSACH (mild)	TC-Domäne	1	(Briggs <i>et al.</i> , 1998)
T585R	MED	TC-Domäne	1	(Briggs <i>et al.</i> , 1998)
H587R	PSACH	TC-Domäne	1	(Deere <i>et al.</i> , 1998)

7.2 cDNA- und Protein-Sequenz von rekombinantem, reifem rCOMP

In der Sequenz von rekombinantem Ratten-COMP (rCOMP) sind die Domänengrenzen, einige bei der Konstruktion der cDNA-Klone genutzte Restriktionsenzymschnittstellen (Nukleotide: fett, unterstrichen) sowie die beiden N-Glycosylierungsstellen eingezeichnet. Die beobachteten Publikationsfehler und die zur Klonierung an den Enden eingeführten Veränderungen gegenüber der publizierten cDNA-Sequenz sind in der cDNA-Sequenz durch kleine Buchstaben kenntlich gemacht. Bei der Expression mit dem Vektor pCEP-Pu verbleiben nach Abspaltung des BM-40-Signalpeptides aminoterminal vier Peptidreste (H_3N^+ -A-P-L-A-...), während *in vivo* die Sequenz von reifem Ratten-COMP mit H_3N^+ -Q-G-Q-I... beginnt. Die Numerierung der Aminosäuren bezieht sich hier auf die erste AS des reifen rCOMP.

```

                NheI
1  gccccgctagcccAGGGCCAGATCCCGCTGGGTGGAGACCTAGCCCCACAGATGCTTCGA
1  A P L A Q G Q I P L G G D L A P Q M L R
                                |> Oligomerisierungs-Domäne

61  GAACTCCAGGAGACTAATGCGGCGCTGCAAGACGTGAGAGAGCTCTTGCGACAgcaGGTC
21  E L Q E T N A A L Q D V R E L L R Q Q V

121  AAGGAGATCACCTTCCTGAAGAATACGGTGATGGAATGTGACGCTTGCGGAATGCAGCCC
41  K E I T F L K N T V M E C D A C G M Q P
                                Oligomerisierungs-Domäne <|

181  GCACGCACCCCCGGTCTGAGCGTGCGGCCAGTgcCGCTCTGCGCACCCGGCTCCTGCTTC
61  A R T P G L S V R P V P L C A P G S C F
    |> Beginn der Ψ-Monomere                                |> 1. EGF-Domäne &
                                                                Beginn von mCOMP

241  CCTGGCGTAGTCTGCACGGAGACAGCTACCGGCGCGCGCTGCGGCCCTGCCCTCCGGGC
81  P G V V C T E T A T G A R C G P C P P G

301  TACACCGGCAACGGCTCGCACTGCACCGACGTTAATGAGTGCAACGCTCACCCCTGTTTC
101  Y T G N G S H C T D V N E C N A H P C F
        LN101 Glycosylierung                                |> 2. EGF-Domäne

361  CCGCGCGTGCGGTGCATCAATACCAGCCCTGGCTTTCACTGCGAAGCCTGTCCCCCTGGG
121  P R V R C I N T S P G F H C E A C P P G

                ApaI
421  TTCAGCGGGCCCACCCACGAGGGTGTGGGGCTGACCTTCGCCAAGACCAACAACAAGTT
141  F S G P T H E G V G L T F A K T N K Q V

481  TGCACAGATATTAATGAGTGTGAGACCGGGCAGCACAATTGCGTTCCCAACTCCGTGTGC
161  C T D I N E C E T G Q H N C V P N S V C
                                |> 3. EGF-Domäne

541  GTCAACACCCGGGGCTCCTTCCAGTGCGGTCCCTGCCAGCCCGGCTTCGTGGGCGACCAG
181  V N T R G S F Q C G P C Q P G F V G D Q

```

601 AGGTCAGGCTGCCAGCGGCGTGGGCAACACTTCTGCCCCGACGGGTACCCAGCCCCGTGC
 201 R S G C Q R R G Q H F C P D G S P S P C
 |> 4. EGF-Domäne &
 Beginn von EGF-T3

661 CATGAGAAAGCAGACTGTATTTTGGAGCGCGACGGCTCAAGGTCCTGCGTGTGTGCGGTC
 221 H E K A D C I L E R D G S R S C V C A V

721 GGCTGGGCCGGCAACGGGCTCCTGTGCGGACGCGACACAGACCTGGACGGTTTCCCGGAC
 241 G W A G N G L L C G R D T D L D G F P D
 |> 1. Typ 3 Motiv & Beginn von T3

781 GAGAAGCTTCGCTGCTCAGAGCGCCAGTGCCGCAAGGACAACCTGCGTGACGGTGCCCAAT
 261 E K L R C S E R Q C R K D N C V T V P N
 |> 2. Typ 3 Motiv &
 Beginn von T3-7x

841 TCAGGGCAGGAGGATGTGGACCGGGACgGCATTGGAGATGCTTGTGACCCGGATGCGGAC
 281 S G Q E D V D R D G I G D A C D P D A D

BstBI
 901 GGGGATGGAGTCCCTAATGAGCAAGACAATTGCCCGCTGGT**TTTCGAA**ACCCAGACCAGCGC
 301 G D G V P N E Q D N C P L V R N P D Q R
 |> 3. Typ 3 Motiv

961 AACTCgGATAAAGACAAGTGGGGAGATGCCTGCGACAACCTGCCGGTCCCAGAAGAATGAT
 321 N S D K D K W G D A C D N C R S Q K N D
 L Trp 344 |> 4. Typ 3 Motiv

1021 GACCAGAAAGATACAGACCGGGATGGCCAGGGCGATGCCTGCGACGACGACATAGATGGC
 341 D Q K **D** T D R D G Q G D A C D D D I D G
 L D361Y Mutagenese

1081 GATCGAATCCGAAATGTAGCTGACAACCTGTCCCCGGGTGCCCAACTTTGACCAGAGTGAC
 361 D R I R N V A D N C P R V P N F D Q S D
 |> 5. Typ 3 Motiv

1141 AGCGATGGTGATGGTGTGGGGATGCCTGTGACAATTGTCCCCAGAAAGACAACCCGGAC
 381 S D G D G V G D A C D N C P Q K D N P D
 |> 6. Typ 3 Motiv

1201 CAGAGGGACGTGGACCACGACTTTGTGGGTGATGCCTGTGACAGTGACCAAGACCAGGAC
 401 Q R D V D H D F V G D A C D S D Q D Q D

1261 GGGGATGGACACCAAGACTCCCGGGACAACCTGCCCCACAGTGCCCAACAGTGCCCAGCAG
 421 G D G H Q D S R D N C P T V P N S A Q Q
 |> 7. Typ 3 Motiv

1321 GACTCAGACCATGATGGCAAGGGTGATGCCTGTGATGATGACGACGACAATGACGGAGTC
 441 D S D H D G K G D A C **D D D D** N **D** G V
 D469Δ L D475N
 Mutagenese Mutagenese

1381 CCTGACAGCCGGGACAATTGCCGCTTGGTGCCCAACCCGGGCCAAGAGGACAATGACCGG
 461 P D S R D N C R L V P N P G Q E D N D R
 |> 8. Typ 3 Motiv

1441 GATGGCGTGGGTGACGCTTGTCTAGGGTGACTTCGATGCTGACAAGGTTATAGACAAGATC
 481 D G V G D A C Q G D F D A D K V I D K I

1501 GATGTGTGCCCCGAGAACGCCGAGGTCACCTCTCACC GACTTCAGGGCCTTCCAAACAGTT
 501 D V C P E N A E V T L T D F R A F Q T V
 Carboxyterminus v. <| |> Anfang der TC-Domäne
 EGF-T3, T3, T3-7x

1561 GTGCTGGACCCCGAGGGTGATGCGCAGATCGACCCCAACTGGGTGGTGCTCAATCAGGGA
 521 V L D P E G D A Q I D P N W V V L N Q G

1621 ATGGAGATCGTTCAGACCATGAACAGTGACCCTGGCCTGGCTGTGGGTTACACGGCATTC
 541 M E I V Q T M N S D P G L A V G Y T A F

1681 AACGGTGTAGATTTTGAGGGAACGTTCCATGTAAACACCGCCACCGATGATGACTACGCT
 561 N G V D F E G T F H V N T A T D D D Y A

1741 GGCTTCATCTTTCGGCTATCAAGACAGCTCAAGTTTCTATGTGGTCATGTGGAACAGATG
 581 G F I F G Y Q D S S S F Y V V M W K Q M

1801 GAGCAGACGTACTGGCAGGCCAATCCTTTCCGGGCAGTGGCTGAACCAGGGATTTCAGCTC
 601 E Q T Y W Q A N P F R A V A E P G I Q L

1861 AAGGCTGTCAAGTCCTCTACAGGTCCCGGGGAACAGCTCCGAAATGCGTTGTGGCACACG
 621 K A V K S S T G P G E Q L R N A L W H T

1921 GGGGACACAGCATCCCAGGTGCGGCTGCTGTGGAAGGATCCTCGAAATGTGGGCTGGAAG
 641 G D T A S Q V R L L W K D P R N V G W K

1981 GATAAGACATCCTACCGCTGGTTCCTGCAGCACCGGCCTCAAGTCGGCTACATCAGGGTG
 661 D K T S Y R W F L Q H R P Q V G Y I R V

2041 CGGTTCTATGAGGGTCCTGAGCTAGTAGCTGACAGCAACGTGGTGCTGGACACAGCTATG
 681 R F Y E G P E L V A D S N V V L D T A M

2101 CGTGGTGGCCGCCTGGGTGTCTTCTGCTTCTCCCAAGAGAATATCATCTGGGCTAACCTG
 701 R G G R L G V F C F S Q E N I I W A N L

2161 CGCTACCGTTGCAATGATACAATCCCTGAGGACTATGAGCGTCACCGGCTGCGGAGGGCC
 721 R Y R C N D T I P E D Y E R H R L R R A
 L^{N722} Glycosylierung

NotI..

2221 TAG**gcggccgc**
 L¹ amber-Stopcodon

7.3 Sequenzvergleich von TSP3, TSP4 und COMP

Die Proteinsequenzen der pentamerisierenden Mitglieder der Thrombospondin-Familie aus Mensch, Maus, Ratte und Krallenfrosch sind auf den Translationsstart *in vivo* bezogen nummeriert. Dargestellt ist bei TSP3 und TSP4 die Sequenz kurz vor Beginn der Oligomerisierungsdomäne, also ohne die aminoterminal Heparin-bindende Domäne; entsprechend sind die COMPs ohne Signalpeptid dargestellt.

Die Angleichung der Sequenzen wurde mit *pileup* bzw. *lineup* (GCG-Paket der Universität von Wisconsin) und GeneDoc (Karl Nicholas) durchgeführt. Mit *boxshade* (Kay Hoffmann) wurden die identischen (dunkelgrau unterlegt) und ähnlichen Aminosäuren (hellgrau unterlegt) bzw. der Konsensus (identische Reste in allen Sequenzen; schwarz unterlegt) markiert. Drei gleiche oder ähnliche Aminosäuren waren das Minimal-Kriterium für eine Markierung aufgrund von Übereinstimmung. Die Bewertung der 'Ähnlichkeit' von Aminosäuren erfolgte anhand der PAM250 Matrix ('*point accepted mutations*').

tsp3_human	217	T	L	H	S	L	Q	T	A	T	L	F	N	I	L	V	D	R	D	V	E	L	N	T	E	C	V	C	G	F	H	E	...	
tsp3_mouse	217	T	S	L	Q	S	L	Q	T	A	T	L	F	N	I	L	V	D	R	D	V	E	L	N	T	E	C	V	C	G	F	H	E	...
tsp4_human	209	E	P	L	A	T	G	T	F	N	F	G	Q	L	N	L	L	G	R	V	E	T	N	T	A	E	C	C	G	P	L	K	F	Q
tsp4_rat	227	E	P	L	A	T	G	T	F	N	F	G	Q	L	N	L	L	G	R	V	E	T	N	T	A	E	C	C	G	P	L	S	F	Q
tsp4_xenla	207	K	S	E	A	Q	Q	T	S	G	Q	M	N	M	L	G	R	V	E	T	M	N	T	A	E	C	C	G	G	D	F	P		
comp_human	20	Q	S	G	S	G	P	R	E	Q	E	N	A	L	Q	W	R	V	E	N	T	E	C	D	C	G	Q	S	V	R				
comp_maus	19	Q	I	G	A	P	R	E	Q	E	N	A	L	Q	R	H	E	V	E	N	T	E	C	D	C	G	A	R						
comp_rat	19	Q	I	G	A	P	R	E	Q	E	N	A	L	Q	R	V	E	N	T	E	C	D	C	G	A	R								

tsp3_human	274QRSHCS	N	CF	GVDQM	VY	G	CGPCP	GLQNG	C	D				
tsp3_mouse	274QRSHCS	S	CF	GVDQM	VY	G	CGPCP	GLQNG	C	D				
tsp4_human	269	TPS	AP	PRRCDSN	CF	GVQC	R	G	QCGPCPEG	GNGITC	D				
tsp4_rat	287	TPN	P	TRRCDS	CF	GVRC	R	G	QCGPCPDG	GNGITC	D				
tsp4_xenla	267	LPTKVPQR	TTT	K	RCDATS	CF	GVRCI	EG	G	QCGPCPEG	GNGVIC	D			
comp_human	80	T	P	LLHCA	FCF	GVACIQ	ES	GG	CGPCPAG	GNG	C	D		
comp_maus	79	V	LCA	SCF	GVVC	AT	GA	CGPCP	G	GNG	C	D
comp_rat	79	V	LCA	SCF	GVVC	AT	GA	CGPCP	G	GNG	C	D

tsp3_human	317	EC	H	DPC		SSC	N	MPGF	C	CPRG	KG	Q	SG	G	D	A	SKQVCND	DECND		
tsp3_mouse	317	EC	H	DPC		SSC	N	MPGF	C	CP	G	KG	TR	SG	G	D	A	SKQVCND	DECND	
tsp4_human	327	DEC	KY	PC		HC	NL	PGFRC		CPVG	G	M	G	G	A	S	KQVC	D	DEC..	
tsp4_rat	345	DEC	KY	PC		CTNL	LA	PGFRC		CPVG	G	M	G	G	N	A	T	KQVC	D	DEC..
tsp4_xenla	322	DEC	RLN	PC	L	C	N	PGFKC		SCP	G	GS	G	G	N	A	Q	KQVC	DTNEC	N
comp_human	128	EC	.	PC	R	C	N	PGFRC		CP	G	G	H	G	G	A	A	KQVC	D	NEC
comp_maus	126	EC	.	PC	R	C	N	PGF	C	CP	G	G	HEG	G		A	S	KQVC	D	NEC
comp_rat	126	EC	.	PC	R	C	N	PGF	C	CP	G	G	HEG	G		A	T	KQVC	D	NEC

tsp3_human	377			CD	NS	CTNTVGS	CG	C	LG	GNQ	QGCL..	A	TCHS	AH	C	I	AHC	F		
tsp3_mouse	377			CD	NS	CTNTVGS	CG	C	LG	GNQ	QGC.V..	A	TCHS	AH	C	I	AHC	F		
tsp4_human	384	.	R	C	NS	CNTLGS	CG	C	G	TG	QIRGC..	VE	NCRN	ELN	CSVNA	C	E			
tsp4_rat	402	.	R	C	INS	CNTLGS	CG	C	G	TG	QIRGC..	TE	SCRN	EQN	CSV	A	C	E		
tsp4_xenla	381	R		CT	NS	CNTMGS	CGGC	G	G	QIKGC..	E	SCRH	GQN	C	ASA	CSE				
comp_human	187		HN.	C	NS	CNTGS	QCG	CG	G	G	QA	GC	GAQ	CP	G		EC	ADC	L	
comp_maus	185		HN.	C	NS	CNTGS	QCG	CG	G	G	Q	GC	GQH	CP	G		C	KA	C	L
comp_rat	185		HN.	C	NS	CNTGS	QCG	CG	G	G	QR	GC	GQH	CP	G		C	KADC	L	

tsp3_human	435	E	N	G	A	C	Q	C	N	V	G	W	A	G	.	G	N	C	G	T	D	D	D	P	D	Q	A	L	C	.	N	N	H	C	Q	D	N	C	L	T	P	N	S	G	Q	E	D			
tsp3_mouse	435	E	N	G	A	C	Q	C	N	V	G	W	A	G	.	G	N	C	G	P	D	D	D	P	D	Q	A	L	C	.	N	N	H	C	Q	D	N	C	L	T	P	N	S	G	Q	E	D			
tsp4_human	441	E	Q	G	D	C	C	C	V	G	W	A	G	.	D	G	C	G	D	V	D	D	S	P	D	E	L	C	.	.	A	.	C	.	D	N	C	K	Y	.	P	N	S	G	Q	E	D			
tsp4_rat	459	E	Q	G	D	C	C	C	V	G	W	A	G	R	A	G	C	G	D	V	D	D	S	P	D	E	L	C	.	.	A	.	C	.	D	N	C	K	Y	.	P	N	S	G	Q	E	D			
tsp4_xenla	438	E	.	G	D	C	T	C	S	V	G	W	A	G	.	G	C	G	D	D	D	D	P	D	A	L	C	.	.	P	.	C	.	D	N	C	.	Y	.	P	N	S	G	Q	E	D				
comp_human	246	E	.	G	S	R	C	C	R	V	G	W	A	G	.	G	I	C	G	D	D	D	D	P	D	K	L	R	C	.	.	P	.	P	.	C	.	D	N	C	.	T	.	P	N	S	G	Q	E	D
comp_maus	244	E	.	G	S	R	C	C	V	G	W	A	G	.	G	L	C	G	D	D	D	D	P	D	K	L	R	C	C	.	D	N	C	.	T	.	P	N	S	G	Q	E	D			
comp_rat	244	E	.	G	S	R	C	C	V	G	W	A	G	.	G	L	C	G	D	D	D	D	P	D	K	L	R	C	C	.	D	N	C	.	T	.	P	N	S	G	Q	E	D			

tsp3_human	494	D	N	D	.	G	D	Q	C	D	D	A	D	G	D	G	.	K	N	V	E	D	N	C	R	L	F	P	N	K	D	Q	Q	N	.	D	T	D	S	.	G	D	A	C	D	N	C	P	N	.	P	N	.	D	Q	.	D	T		
tsp3_mouse	494	D	N	D	.	G	D	Q	C	D	D	A	D	G	D	G	.	K	N	V	E	D	N	C	R	L	F	P	N	K	D	Q	Q	N	.	D	T	D	S	.	G	D	A	C	D	N	C	P	N	.	P	N	.	D	Q	.	D	T		
tsp4_human	498	.	D	.	D	.	G	D	.	C	D	D	A	D	G	D	G	.	L	N	.	D	N	C	V	L	.	H	N	V	D	Q	.	N	.	D	.	D	I	.	G	D	A	C	D	N	C	L	.	.	L	N	.	D	Q	.	D	T		
tsp4_rat	517	.	D	.	D	.	G	D	.	C	D	D	A	D	G	D	G	.	L	N	.	D	N	C	V	L	.	T	H	N	V	D	Q	.	N	.	D	.	D	I	.	G	D	A	C	D	N	C	.	G	.	L	N	.	D	Q	.	D	T	
tsp4_xenla	495	T	D	.	D	.	G	D	.	C	D	D	A	D	G	D	G	.	L	N	.	D	N	C	V	L	.	A	A	N	I	D	Q	.	N	.	D	.	D	I	.	G	D	A	C	D	N	C	.	L	T	L	N	.	D	Q	.	D	T	
comp_human	303	V	D	.	D	.	G	D	.	C	D	P	D	A	D	G	D	G	.	P	N	.	K	.	D	N	C	P	L	.	.	N	.	D	Q	.	N	.	D	E	D	K	.	G	D	A	C	D	N	C	.	Q	K	N	D	D	Q	.	D	T
comp_maus	301	V	D	.	D	.	G	D	.	C	D	P	D	A	D	G	D	G	.	P	N	.	D	N	C	P	L	.	.	N	.	D	Q	.	N	.	D	S	D	K	.	G	D	A	C	D	N	C	.	K	K	N	D	D	Q	.	D	T		
comp_rat	301	V	D	.	D	.	G	D	.	C	D	P	D	A	D	G	D	G	.	P	N	.	D	N	C	P	L	.	.	N	.	D	Q	.	N	.	D	.	D	K	.	G	D	A	C	D	N	C	.	Q	K	N	D	D	Q	.	D	T		

tsp3_human	554	D	.	N	G	E	G	D	A	C	.	N	D	.	D	G	D	.	I	P	N	G	.	D	N	C	.	.	P	N	P	L	Q	.	D	.	D	E	D	G	.	G	D	.	C	P	.	M	.	N	P	T	Q	.	D	A	D						
tsp3_mouse	554	D	.	N	G	E	G	D	A	C	.	N	N	D	.	D	G	D	.	I	P	N	G	.	D	N	C	.	.	P	N	P	L	Q	.	D	.	D	E	D	G	.	G	D	.	C	P	.	M	.	N	P	T	Q	.	D	A	D					
tsp4_human	558	D	.	.	G	.	G	D	A	C	.	.	D	.	D	G	D	.	I	.	N	.	D	N	C	.	.	F	P	N	R	.	Q	R	D	.	D	.	D	G	.	G	D	.	C	P	.	V	.	N	P	N	Q	.	D	.	D						
tsp4_rat	577	D	.	.	G	.	G	D	A	C	.	.	D	.	D	G	D	.	I	.	N	.	D	N	C	.	.	P	N	R	.	Q	Q	D	.	D	.	D	G	.	G	D	.	C	P	.	V	.	N	P	N	Q	.	D	.	D							
tsp4_xenla	555	D	.	N	.	G	.	G	D	A	C	.	.	D	.	D	G	D	.	I	.	N	.	D	N	C	.	Q	.	P	N	V	.	Q	K	D	.	D	.	D	G	.	G	D	.	I	C	D	.	C	P	.	I	I	N	P	N	Q	.	D	.	D	
comp_human	363	D	Q	.	G	.	G	D	A	C	.	.	D	.	D	G	D	.	R	I	.	N	.	Q	A	D	N	C	.	.	P	N	S	.	Q	K	D	S	D	.	D	G	.	G	D	.	C	D	N	C	P	Q	.	.	N	P	D	Q	A	D	.	D	
comp_maus	361	D	L	.	G	.	G	D	A	C	.	.	D	.	D	G	D	.	R	I	.	N	.	A	D	N	C	.	.	P	N	F	.	Q	.	D	S	D	.	D	G	.	G	D	.	C	D	N	C	P	Q	.	.	D	N	P	D	Q	R	D	.	D	
comp_rat	361	D	R	.	G	Q	.	G	D	A	C	.	.	D	.	D	G	D	.	R	I	.	N	.	A	D	N	C	.	.	P	N	F	.	Q	.	D	S	D	.	D	G	.	G	D	.	C	D	N	C	P	Q	.	.	D	N	P	D	Q	R	D	.	D

tsp3_human	614	S	D	.	V	G	D	V	C	D	.	E	D	.	D	G	D	G	H	Q	D	.	D	N	C	P	Q	.	.	N	S	S	Q	.	D	.	D	N	D	G	.	G	D	.	C	D	G	.	D	D	D	N	D	G	.	P	D	Y	.	.
tsp3_mouse	614	S	D	.	V	G	D	V	C	D	.	E	D	.	D	G	D	G	H	Q	D	.	D	N	C	P	Q	.	.	N	S	S	Q	.	D	.	D	N	D	G	.	G	D	.	C	D	G	.	D	D	D	N	D	G	.	P	D	Y	.	.
tsp4_human	618	N	D	.	V	G	D	S	C	D	.	.	D	.	D	G	D	G	H	Q	D	.	T	D	N	C	P	.	.	I	N	S	.	Q	.	D	.	D	K	D	G	.	G	D	.	C	D	.	D	D	D	N	D	G	.	P	D	L	.	.
tsp4_rat	637	N	D	.	V	G	D	S	C	D	.	.	D	.	D	G	D	G	H	Q	D	.	T	D	N	C	P	.	.	I	N	S	.	Q	.	D	.	D	K	D	G	.	G	D	.	C	D	.	D	D	D	N	D	G	.	P	D	L	.	F
tsp4_xenla	615	N	D	.	V	G	D	S	C	D	.	.	D	.	D	G	D	G	H	Q	D	.	T	D	N	C	P	.	.	I	N	S	N	Q	.	D	.	D	K	D	G	.	G	D	.	C	D	.	D	D	D	N	D	G	.	P	D	T	.	.
comp_human	423	H	D	F	V	G	D	A	C	D	.	D	.	D	Q	D	G	D	G	H	Q	D	.	D	N	C	P	.	.	N	S	.	Q	Q	D	.	D	H	D	C	K	.	G	D	A	C	D	.	D	D	D	N	D	G	.	P	D	.	.	.
comp_maus	421	H	D	F	V	G	D	A	C	D	.	D	.	D	Q	D	G	D	G	H	Q	D	.	D	N	C	P	.	.	N	S	.	Q	Q	D	.	D	H	D	C	K	.	G	D	A	C	D	.	D	D	D	N	D	G	.	P	D	.	.	
comp_rat	421	H	D	F	V	G	D	A	C	D	.	D	.	D	Q	D	G	D	G	H	Q	D	.	D	N	C	P	.	.	N	S	.	Q	Q	D	.	D	H	D	C	K	.	G	D	A	C	D	.	D	D	D	N	D	G	.	P	D	.	.	

tsp3_human	674	.	.	.	D	N	C	.	L	V	P	N	P	N	Q	K	D	.	G	N	G	V	G	D	.	C	.	.	D	F	D	.	D	A	V	.	D	P	.	D	V	C	P	E	S	A	.	T	L	T	D	F	R	A	.	Q	T	V	.			
tsp3_mouse	674	.	.	.	D	N	C	.	L	V	P	N	P	N	Q	K	D	.	G	N	G	V	G	D	.	C	.	.	D	F	D	.	D	A	V	.	D	P	.	D	V	C	P	E	S	A	.	T	L	T	D	F	R	A	.	Q	T	V	.			
tsp4_human	678	.	.	.	D	N	C	.	L	V	P	N	P	.	Q	.	D	.	N	S	.	G	V	G	D	.	C	.	.	S	D	F	D	.	D	Q	V	.	D	.	D	V	C	P	E	.	A	.	T	L	T	D	F	R	A	.	Q	T	V	.		
tsp4_rat	697	.	.	.	D	N	C	.	L	V	P	N	P	.	Q	.	D	.	N	N	.	G	V	G	D	.	C	.	.	A	D	F	D	.	D	.	V	.	D	.	D	V	C	P	E	.	A	.	T	L	T	D	F	R	A	.	Q	T	V	.		
tsp4_xenla	675	.	.	.	D	N	C	.	L	V	P	N	P	.	Q	.	D	.	D	N	N	.	G	V	G	D	.	C	.	.	A	D	F	D	.	D	.	T	V	.	D	.	D	V	C	P	E	.	A	.	T	L	T	D	F	R	A	.	Q	T	V	.
comp_human	480	.	.	S	R	D	N	C	.	L	V	P	N	P	.	Q	.	D	A	.	.	G	V	G	D	.	C	Q	.	.	D	F	D	A	.	D	.	V	.	D	.	D	V	C	P	E	.	A	.	T	L	T	D	F	R	A	.	Q	T	V	.	
comp_maus	478	.	.	S	R	D	N	C	.	L	V	P	N	P	.	Q	.	D	N	.	.	G	V	G	D	A	C	Q	Q	.	.	D	F	D	A	.	D	.	V	.	D	.	D	V	C	P	E	.	A	.	T	L	T	D	F	R	A	.	Q	T	V	.
comp_rat	478	.	.	S	R	D	N	C	.	L	V	P	N	P	.	Q	.	D	N	.	.	G	V	G	D	A	C	Q	Q	.	.	D	F	D	A	.	D	.	V	.	D	.	D	V	C	P	E	.	A	.	T	L	T	D	F	R	A	.	Q	T	V	.

tsp3_human	734	L	D	P	E	G	D	A	Q	I	D	P	N	W	.	V	L	N	Q	G	.	E	I	V	Q	T	M	N	S	D	P	G	L	A	V	G	Y	T	A	F	N	G	V	D	F	E	G	T	F	H	V	N	T	.	T	D	D	D	
------------	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--

tsp3_human	794	F	FSYQDS	GRFYVVMWKQ	EQTYWQA	PFRAVA	QPG	QLKAV	TSV	GPGE	LRN	LWHTG	
tsp3_mouse	794	F	FSYQDS	GRFYVVMWKQ	EQTYWQA	PFRAVA	QPG	QLKAV	TSI	GPGE	LRN	LWHTG	
tsp4_human	798	F	F	YQDS	FYVVMWKQ	EQTYWQA	PFRAVA	PG	QLKAV	SK	GPGE	LRNSLWHTG	
tsp4_rat	817	F	F	YQDS	FYVVMWKQ	EQTYWQA	PFRAVA	PG	QLKAV	SK	GPGE	LRNSLWHTG	
tsp4_xenla	795	F	F	YQDS	FYVVMWKQ	EQTYWQA	PFRAVA	PG	QLKAV	SK	GPGE	LRN	LWHTG
comp_human	599	F	F	YQDS	FYVVMWKQ	MEQTYWQAN	PFRAVA	PG	QLKAV	SS	GPGE	QLRN	LWHTG
comp_maus	597	F	F	YQDS	FYVVMWKQ	MEQTYWQAN	PFRAVA	PG	QLKAV	SS	GPGE	QLRN	LWHTG
comp_rat	597	F	F	YQDS	FYVVMWKQ	MEQTYWQAN	PFRAVA	PG	QLKAV	SS	GPGE	QLRN	LWHTG

tsp3_human	854	HTP	QVRLLWTD	RNVG	DK	SYRW	QL	HRPQVGYIR	LYEG	QLVADS	V	DT	MR	
tsp3_mouse	854	HTP	QVRLLWTD	RNVGL	DK	SYRW	RL	HRPQVGYIR	LYEG	QLVADS	V	DT	MR	
tsp4_human	858	TS	QVRLLW	DSRNVG	DKV	SYRW	L	HRPQVGYIR	YEGS	LVADS	VT	DT	MR	
tsp4_rat	877	TS	QVRLLW	DSRNVG	DKV	SYRW	L	HRPQVGYIR	YEGS	LVADS	VT	DT	MR	
tsp4_xenla	855	TN	QVRLLW	D	RNVG	DKV	SYRW	L	HRPQVGYIRA	YEGT	LVADS	VT	DT	MR
comp_human	659	TES	QVRLLW	D	RNVG	DKK	SYRW	L	HRPQVGYIR	YEG	LVADSNV	DT	MR	
comp_maus	657	TAS	QVRLLW	D	RNVG	DK	SYRW	L	HRPQVGYIR	YEG	LVADSNV	DT	AMR	
comp_rat	657	TAS	QVRLLW	D	RNVG	DK	SYRW	L	HRPQVGYIR	YEG	LVADSNV	DT	AMR	

tsp3_human	914	GGRLGVFCFSQENIIW	NLQ	YRCNDT	PED	P	RR	LLQG	V
tsp3_mouse	914	GGRLGVFCFSQENIIW	NLQ	YRCNDT	PED	P	RR	LLQG	V
tsp4_human	918	GGRLGVFCFSQENIIW	NL	YRCNDT	PED	QE	QT	DRFD	
tsp4_rat	937	GGRLGVFCFSQENIIW	NL	YRCNDT	PED	QE	Q	T	DRLD
tsp4_xenla	915	GGRLGVFCFSQENIIW	NL	YRCNDT	PED	QA	QA	SS..	
comp_human	719	GGRLGVFCFSQENIIW	NL	YRCNDT	PED	THQ	R	A....	
comp_maus	717	GGRLGVFCFSQENIIW	NL	YRCNDT	PED	SHR		RV....	
comp_rat	717	GGRLGVFCFSQENIIW	NL	YRCNDT	PED	RHR		RRA....	

7.4 Die Pentamerisierungsdomänen von TSP3, TSP4 und COMP

Die pentamere Superhelix wird durch intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen der apolaren Seitengruppen in Position 'a' und 'd' (grau unterlegt), einen von den Glutamin-/Glutamat-Seitengruppen in Position 'd' des vierten Heptad gebildeten Ring von Wasserstoffbrückenbindungen (hellgrau unterlegt) und kovalente Disulfidbrücken in Position 'd' und 'g' des letzten Heptad (auch hellgrau unterlegt) stabilisiert und fixiert.

Nicht hervorgehoben sind die Aminosäuren mit geladenen Seitengruppen in Position 'e' und 'g', deren elektrostatische Interaktionen ebenfalls zur Stabilisierung beitragen (nach: Efimov *et al.*, 1996; Malashkevich *et al.*, 1996).

Heptadsequenz	abc	defg	abc	defg	abc	defg	abc	defg	abc	defg
tsp3_human:	GEQ	TKALVTQ	LTLFNQI	LVELRDD	IRDQVKE	MSLIRNT	IMECQVC	G		
tsp3_mouse:	GEQ	TKALVTQ	LTLFNQI	LVELRDD	IRDQVKE	MSLIRNT	IMECQVC	G		
tsp4_human:	GDF	NRQFLGQ	MTQLNQI	LGEVKDL	LRQQVKE	TSFLRNT	IAECQAC	G		
tsp4_rat :	GDF	NRQFLGQ	MTQLNQI	LGEVKDL	LRQQVKE	TSFLRNT	IAECQAC	G		
tsp4_xenla:	GDV	SRQLIGQ	ITQMNQM	LGEVRDV	MRQQVKE	TMFLRNT	IAECQAC	G		
comp_human:	SDL	GPQMLRE	LQETNAA	LQDVRED	LRQQVRE	ITFLKNT	VMECDAC	G		
comp_maus :	GDL	APQMLRE	LQETNAA	LQDVREL	LRHEVKE	ITFLKNT	VMECDAC	G		
comp_rat :	GDL	APQMLRE	LQETNAA	LQDVREL	LRQQVKE	ITFLKNT	VMECDAC	G		

7.5 Gruppierung der Typ 3 Motive nach ihrer Homologie zum Konsensus der Ca²⁺-Bindungsstelle in der EF-Hand

(modifiziert, nach: Chen *et al.*, 2000)

Motiv #1	D T D L D G F P D E K L R C S E R Q C R K D N C V P N S G Q E
Motiv #2	D V D R D G I G D A C D P
	D A D G D G V P N E Q D N C P L V R N P D Q R
Motiv #3	N S D K D K W G D A C D N C R S Q K N D D Q K
Motiv #4	D T D R D G Q G D A C D D
	D I D G D R I R N V A D N C P R V P N F D Q S
Motiv #5	D S D G D G V G D A C D N C P Q K D N P D Q R
Motiv #6	D V D H D F V G D A C D S D Q
	D Q D G D G H Q D S R D N C P T V P N S A Q Q
Motiv #7	D S D H D G K G D A C D D
	D D D N D G V P D S R D N C R P N P G Q E
Motiv #8	D N D R D G V G D A C Q G
	D F D A D K V I D K I D V C P E N
Konsensus	D x D x D G x x D x x D
EF-Hand	X * Y * Z G -Y * -X * * -Z

Danksagung

Herrn Professor Dr. Mats Paulsson und Herrn Dr. Patrik Maurer danke ich sehr für die Themenstellung, die rat- und tatkräftige Unterstützung und die Diskussionsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen, für ihr unerschütterliches Vertrauen, das sie stets in meine Arbeit gesetzt haben und nicht zuletzt für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, unter denen ich die Arbeit durchführen konnte.

Herrn Professor Dr. D. Schomburg danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens, und Herrn Professor Dr. B. Kemper danke ich für seine Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz für meine Disputation zu übernehmen.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Institut, für ihre große Hilfsbereitschaft und ihre Diskussionsfreudigkeit bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit einen nicht zu unterschätzenden Teil beisteuerte.

Bei Patric Nitsche bedanke ich mich für die durchgeführten elektronenmikroskopischen Arbeiten.

I am grateful to Krisztina Rosenberg in Lund who did the Biacore measurements of my recombinant COMP and who supported me by the gift of tissue-derived bovine COMP. I thank Professor Dr. Dick Heinegård and Dr. Åke Oldberg for the kind gift of the rat COMP cDNA clone.

Bei meiner Lebensgefährtin Bettina und meiner noch jungen Familie möchte ich mich für das lange Jahre strapazierte Verständnis bedanken, das sie mir entgegengebracht haben, und die Freude, die sie mir bereiten. Ohne ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten, den Rückhalt und die Aufmunterung in allen Lebenslagen wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während meines Studiums, und vor allem für die liberale und offene Denkart, in der sie mich erzogen und die mir die Wahl meines Lebensweges erlaubte.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Ablauf des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. M. Paulsson betreut worden.

Köln, den 24.7.2000

Teilveröffentlichung:

Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, P.N., Pihlajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegård, D., Paulsson, M., und Maurer, P. (2000) Mutations in Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) causing Pseudo-achondroplasia and Multiple Epiphyseal Dysplasia affect Binding of Calcium and Collagen I, II and IX. *Journal of Biological Chemistry, in press.*

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jochen Josef Felix Thur
Geburtsdatum	20.8.1966
Geburtsort	Köln
Familienstand	unverheiratet, mit Uta Bettina Uhlig, Apothekerin, zwei Söhne: Julius, geboren 6.7.1997 und Dominik, geboren 31.1.1999
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Anschrift	Neusser Platz 2, 50670 Köln

Schulbildung

1972-1985	Grundschule und Neusprachliches Gymnasium, Köln-Rodenkirchen, Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
-----------	---

Zivildienst

1985-1987	Zivildienst in einer integrativen Tagesstätte für behinderte und nichtbehinderte Jugendliche, Köln-Sürth
-----------	---

Studium

1988	Immatrikulation an der Universität zu Köln, Studiengang Biologie (Diplom)
1990	Vordiplom im Fach Biologie
1990	Nebenfachstudium der Geographie
1993	Mündliche Diplomprüfungen (Genetik, Biochemie, Botanik)
1993-1995	Experimentelle Diplomarbeit an der Universitäts-Hautklinik Köln bei Prof. Dr. Th. Krieg, Arbeitsgruppe PD Dr. N. Hunzelmann; Thema: Quantitative Analyse der Prokollagen $\alpha 1(I)$ Transkripte <i>in vivo</i> mit der kompetitiven Polymerase Kettenreaktion (Betreuer: Prof. Dr. A. Radbruch, Institut für Genetik)
1995-2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter von Professor Dr. M. Paulsson, Institut für Biochemie II der MEK
1996-2000	Promotion bei Professor Dr. M. Paulsson, Arbeitsgruppe Dr. P. Maurer, über 'Die Auswirkungen von Chondrodysplasie-assoziierten Mutationen auf die Struktur und Funktion des Cartilage Oligomeric Matrix Proteins'